

GILVANO EBLING BRONDANI

**MINIESTAQUIA E MICROPROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus benthamii*  
Maiden & Cabbage X *Eucalyptus dunnii* Maiden**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, Centro de Ciências Florestais e da Madeira, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Florestal.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Grossi

Co-orientadores: Dr. Ivar Wendling  
Dr. Leonardo Ferreira Dutra

CURITIBA

2008

***Dedico esse trabalho:***

***Aos meus pais,  
José Amauri e Marisa***

***E aos meus irmãos,  
André e Juliana***

***Os quais sempre estiveram  
presentes em todos os  
momentos.***

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais e irmãos, por todo o esforço, incentivo, amor e exemplo de vida.

À Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa, a qual possibilitou a realização do curso e dedicação exclusiva aos trabalhos.

À Embrapa Florestas, pelo suporte prestado durante as conduções dos experimentos.

Ao Professor Fernando Grossi e aos pesquisadores da Embrapa Florestas, Ivar Wendling e Leonardo Ferreira Dutra, por todos os conselhos, críticas, sugestões e pela amizade.

Aos funcionários da Embrapa Florestas, em especial ao Fabrício, Leonides (nide), Vero, Herry, Paulino e Joel.

Ao Delmar, Eliziane, Sandra, Ariadne, Suelen, Fernanda (baiana) e Levi, pelo coleguismo e amizade.

Aos estudantes de Engenharia Florestal, Jefferson, Dagma e Patrícia, pelo apoio prestado durante a condução dos experimentos.

Aos companheiros de casa estudante, Fábio (burco), Stenio (frouxo), Alexandre (cuia), Márcio (pitú), Silvio (silvinho), Thiago (batatinha), Habib, Rafael (gaúcho), Roger e Edir (cabelinho), pela amizade e companheirismo.

Aos velhos amigos de curso, Luis, Ari, Charlote, Josita, Gládis e Fabrina.

Em especial a Marla, por toda ajuda prestada, compreensão, amizade, incentivo e amor.

Aos componentes da Banca Examinadora, por aceitarem fazer parte desse trabalho e contribuir com seus conhecimentos.

## RESUMO GERAL

No Brasil as espécies de *Eucalyptus* possuem grande destaque na silvicultura, devido a importância econômica, adaptabilidade, diversidade e rapidez no crescimento. No entanto, poucas espécies apresentam aptidão ao cultivo em regiões com ocorrência de baixas temperaturas e geadas frequentes, como as existentes no sul do Brasil. Devido a adaptabilidade a essas condições, o *E. benthamii* e o *E. dunnii* são espécies alternativas ao plantio, principalmente para o abastecimento energético e sólidos madeiráveis. Adicionalmente, híbridos entre os materiais citados poderão apresentar boa opção para futuros programas de plantios florestais. No entanto, não existem informações quanto a obtenção de mudas do híbrido com padrão de qualidade e quantidade desejáveis. O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar as técnicas de miniestaquia e micropropagação como métodos de clonagem do híbrido *E. benthamii* x *E. dunnii*. Para tanto, o trabalho foi dividido em dois estudos. O primeiro referiu-se a miniestaquia com a realização de 27 coletas sucessivas de brotações ao longo de um ano de experimento, considerando-se as quatro estações: primavera, verão, outono e inverno. Avaliou-se também o efeito do ácido indolbutírico (AIB) na promoção dos processos rizogênicos das miniestacas. O segundo estudo incluiu a micropropagação, sendo avaliadas as respostas dos materiais genéticos nas fases de estabelecimento de segmentos nodais *in vitro*, proliferação de gemas adventícias e o alongamento das brotações. Em ambos os estudos, utilizaram-se propágulos de minicepas dos clones H12, H19 e H20 que foram manejadas em minijardim clonal sob sistema semi-hidropônico em leito de areia. Como principais resultados pode-se destacar a grande variabilidade de respostas entre os materiais genéticos. Na miniestaquia, o efeito da sazonalidade e as oscilações da temperatura influenciaram de forma determinante quanto ao sucesso da técnica. A maior produção de miniestacas ocorreu nas estações mais quentes, porém, os melhores índices de enraizamento foram registrados nas estações mais frias. A aplicação do AIB promoveu resultados positivos ao enraizamento das miniestacas. Na micropropagação, os clones apresentaram estabelecimento satisfatório, no entanto, o clone H19 expressou elevada recalcitrância ao cultivo *in vitro*. Para os clones H12 e H20 foi possível estabelecer as combinações mais eficientes dos fitorreguladores benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA) na fase de multiplicação de gemas e, de BAP e ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) no alongamento de brotações. O padrão de resposta para as características avaliadas dependeu da composição básica do meio de cultura, sendo que o ½MS proporcionou as melhores respostas para as características analisadas.

**Palavras-chave:** Propagação vegetativa. Clonagem. Sazonalidade. Cultivo *in vitro*. Multiplicação de genótipos superiores.

## GENERAL ABSTRACT

In Brazil, the *Eucalyptus* species present a great importance for silviculture, because of their economic relevance, adaptability, diversity and fast growth. However, there are few species which present the ability of to be cultivated in low temperature and frequent frosts areas, as those are in South Brazil. The *E. benthamii* and *E. dunnii* present high adaptability for these conditions. Because of this, they are an alternative of planting, especially for energy supply and timber solids. Furthermore, the hybrid of these cited materials would be an excellent option for future forest plantations programs. However, there is no information about the hybrid seedlings production with quantity and quality standard desirable. This study aimed to evaluate both minicutting and micropropagation techniques as cloning methods for *E. benthamii* x *E. dunnii* hybrids. For this, the work was divided in two studies. The first study was referred to the minicutting, where they were realized 27 successive samplings of shoots along one year of the experiment, considering the four seasons: spring, summer, autumn and winter. It was also evaluated the indolebutyric acid (IBA) effect on the minicuttings rooting. The second study included the micropropagation, and assessed the genetic material responses in the establishment phase of nodal segments, under *in vitro* conditions, in the obtaining multiple buds and shoots elongation. In both studies, ministump of H12, H19 and H20 clones were used, which were managed in clonal minigarden under semi-hydroponic system in a sand bed. As main results, it is possible highlight the high variability of responses among clones. Both seasonal effect and temperature fluctuations decisively influenced the minicutting technique success. The greatest minicuttings production occurred in warmer seasons, but the best rooting rates were recorded in cooler seasons. The IBA application promoted positive results in the minicuttings rooting. The clones presented a satisfactory establishment in the micropropagation, even though the H19 clone was recalcitrant under *in vitro* culture conditions. For the H12 and H20 clones, it was possible to establish the most efficient combinations of benzylaminopurine (BAP) and naphthaleneacetic acid (NAA) plant regulators for buds multiplication phase, and gibberelic acid (GA<sub>3</sub>) for shoots elongation phase. The standard response of the evaluated characteristics depended on the culture medium basic composition, where the 1/2MS promoted the best results to the evaluated characteristics.

**Key words:** Vegetative propagation. Cloning. Seasonality. *In vitro* cultivation. Superiors genotypes multiplication.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DE LITERATURA

- FIGURA 1 - Distribuição geográfica de *Eucalyptus benthamii* na região de ocorrência natural. Fonte: Butcher, Skinner e Gardiner (2005). ..... 6
- FIGURA 2 - Distribuição geográfica de *Eucalyptus dunnii* na região de ocorrência natural. Fonte: Jovanovic, Arnold e Booth (2000). ..... 11

### CAPÍTULO I

- FIGURA 1 - (a): detalhe do minijardim clonal de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* e, (b): brotações aptas para a coleta. Foto: Brondani (2006). ..... 33
- FIGURA 2 - (a): brotação logo após a coleta da minicepa de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, contendo a ponteira e 3 pares de folhas, (b): detalhe da miniestaca após o preparo e padronização. Foto: Brondani (2006). ..... 35
- FIGURA 3 - Valores médios da sobrevivência de minicepas (SM) dos clones H12, H19 e H20 de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, ao longo de 352 dias de coletas sucessivas de miniestacas.. ..... 41
- FIGURA 4 - Variação da produção de miniestacas por minicepa (PMM) de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, ao longo de 352 dias de coletas sucessivas de brotações, em sistema semi-hidropônico do tipo canaletão em leito de areia. (a): coleta de miniestacas na estação da primavera, (b): verão, (c): outono e (d): inverno.. ..... 44
- FIGURA 5 - Variação da produção de miniestacas por metro quadrado (PMQ) de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, ao longo de 352 dias de coletas sucessivas de brotações, em sistema semi-hidropônico do tipo canaletão em leito de areia. (a): coleta de miniestacas na estação da primavera, (b): verão, (c): outono e (d): inverno.. ..... 45
- FIGURA 6 - Variação da produção de miniestacas por metro quadrado ao ano (PMQA) de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, ao longo de 352 dias de coletas sucessivas de brotações, em sistema semi-hidropônico do tipo canaletão em leito de areia..... 46
- FIGURA 7 - Variação da produção de miniestacas por minicepa (PMM) de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* em função da estação do ano. .... 50
- FIGURA 8 - Variação da produção de miniestacas por metro quadrado (PMQ) de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* em função da estação do ano ..... 51

FIGURA 9 - Variação da sobrevivência de miniestacas de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i> durante a saída da casa de vegetação (SSCV), ao longo de 352 dias de coletas sucessivas de brotações. (a): sobrevivência de miniestacas na estação da primavera, (b): verão, (c): outono e (d): inverno.....	56
FIGURA 10 - Variação da sobrevivência de miniestacas de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i> durante a saída da casa de sombra (SSCS), ao longo de 352 dias de coletas sucessivas de brotações. (a): sobrevivência de miniestacas na estação da primavera, (b): verão, (c): outono e (d): inverno.....	57
FIGURA 11 - Variação do enraizamento de miniestacas de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i> durante avaliação da sobrevivência em área de pleno sol (SAPS), ao longo de 352 dias de coletas sucessivas de brotações. (a): sobrevivência de miniestacas na estação da primavera, (b): verão, (c): outono e (d): inverno.....	58
FIGURA 12 - Variação da sobrevivência de miniestacas de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i> durante a saída da casa de vegetação (SSCV) em função da estação do ano.....	61
FIGURA 13 - Variação da sobrevivência de miniestacas de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i> durante a saída da casa de sombra (SSCS) em função da estação do ano.....	62
FIGURA 14 - Variação do enraizamento de miniestacas de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i> durante avaliação da sobrevivência em área de pleno sol (SAPS) em função da estação do ano.....	64
FIGURA 15 - Variação da sobrevivência de miniestacas dos clones H12, H19 e H20 de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i> durante a saída da casa de vegetação (SSCV) e saída da casa de sombra (SSCS) em função das concentrações de AIB.....	69
FIGURA 16 - Variação da sobrevivência de miniestacas de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i> durante a saída da casa de vegetação (SSCV) (aos 35 dias) e saída da casa de sombra (SSCS) (aos 56 dias) em função das concentrações de AIB. ....	70
FIGURA 17 - Variação do enraizamento de miniestacas dos clones H12, H19 e H20 de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i> durante avaliação da sobrevivência em área de pleno sol (SAPS) em função das concentrações de AIB, aos 86 dias após a miniestaquia.....	71
FIGURA 18 - Variação do comprimento médio de brotos por miniestaca (CMB) dos clones H12, H19 e H20 de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i> durante avaliação em área de pleno sol, aos 86 dias após a miniestaquia.....	72
FIGURA 19 - Mudas dos clones H12, H19 e H20 de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i> produzidas pela técnica de miniestaquia, aos 126 dias de idade. Foto: Brondani (2007).....	74

## CAPÍTULO II

- FIGURA 1 - (a): brotação logo após a coleta da minicepa de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, (b): detalhe da brotação após a remoção das folhas e lavagem superficial e, (c): explante após o preparo e padronização. Foto: Brondani (2007). ..... 92
- FIGURA 2 - Valores médios da contaminação bacteriana, explantes oxidados e explantes estabelecidos de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, aos 21 dias após a inoculação.. ..... 97
- FIGURA 3 - Valores médios do número de gemas (NG) por explante de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* em função dos tratamentos de ANA e BAP, aos 60 dias após a inoculação. (a): clone H12 e (b): clone H20..... 101
- FIGURA 4 - Aspecto visual da proliferação de gemas dos clones H12 e H20 de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, aos 60 dias após a inoculação em meio de cultura  $\frac{1}{2}$ MS nas concentrações de 0,50 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Foto: Brondani (2007)...... 103
- FIGURA 5 - Valores médios do número de brotações alongadas (NB) por explante de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* em função dos tratamentos de GA<sub>3</sub> e BAP, aos 30 dias após a inoculação. (a): clone H12 e (b): clone H20 em meio  $\frac{1}{2}$ MS, (c): clone H12 e (d): clone H20 em meio MS. .... 106
- FIGURA 6 - Valores médios do comprimento de brotações alongadas (CMB) por explante de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* em função dos tratamentos de GA<sub>3</sub> e BAP, aos 30 dias após a inoculação. (a): clone H12 e (b): clone H20 em meio  $\frac{1}{2}$ MS, (c): clone H12 e (d): clone H20 em meio MS..... 107
- FIGURA 7 - Detalhe das brotações alongadas em meio de cultura  $\frac{1}{2}$ MS aos 30 dias após a inoculação dos explantes na combinação de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> para o clone H12 e na combinação de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,2 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> para o clone H20. Foto: Brondani (2007)..... 109



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

TABELA 1 -	Resumo da análise de variância para as características da sobrevivência das minicepas (SM), produção de miniestaca por minicepa (PMM) e produção de miniestaca por metro quadrado (PMQ) de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i> .....	40
TABELA 2 -	Resumo da análise de variância para a característica da produção de miniestaca por metro quadrado ao ano (PMQA) de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i> .....	46
TABELA 3 -	Resumo da análise de variância para as características da produção de miniestaca por minicepa (PMM) e da produção de miniestaca por metro quadrado (PMQ) de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i> .....	49
TABELA 4 -	Resumo da análise de variância para as características da sobrevivência das miniestacas durante saída da casa de vegetação (SSCV), sobrevivência na saída da casa de sombra (SSCS) e sobrevivência em área de pleno sol (SAPS) de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i> .....	54
TABELA 5 -	Resumo da análise de variância para as características da sobrevivência das miniestacas durante saída da casa de vegetação (SSCV), sobrevivência na saída da casa de sombra (SSCS) e sobrevivência em área de pleno sol (SAPS) de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i> .....	59
TABELA 6 -	Resumo da análise de variância para as características da sobrevivência na saída da casa de vegetação (SSCV), saída da casa de sombra (SSCS), sobrevivência em área de pleno sol (SAPS), número de brotações por muda (NB) e comprimento médio de brotações por muda (CMB) de miniestacas de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i> .....	68

### CAPÍTULO II

TABELA 1 -	Resumo da análise de variância para as características da contaminação fúngica (F), contaminação bacteriana (B), explantes oxidados (O), explantes estabelecidos (E), número de folhas (NF), comprimento médio de broto (CMB) e número de brotações (NB) de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i> .....	96
TABELA 2 -	Resumo da análise de variância para as características do número médio de gemas por explante (NG) de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i> .....	100
TABELA 3 -	Resumo da análise de variância para as características do número médio de brotações (NB) e comprimento médio de brotações (CMB) alongadas por explante de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i> .....	104

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b>	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	3
2.1 O <i>Eucalyptus</i>	3
2.2 <i>Eucalyptus benthamii</i>	5
2.3 <i>Eucalyptus dunnii</i>	10
2.4 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA	15
<b>REFERÊNCIAS</b>	19
<b>CAPÍTULO I - MINIASTAQUIA DE <i>Eucalyptus benthamii</i> Maiden &amp; Cambage x <i>Eucalyptus dunnii</i> Maiden</b>	27
<b>RESUMO</b>	27
<b>ABSTRACT</b>	28
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	29
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	32
2.1 CARACTERIZAÇÃO GERAL DO EXPERIMENTO	32
2.2 OBTENÇÃO DOS CLONES E CONSTITUIÇÃO DO MINIJARDIM CLONAL	32
2.3 MANEJO E NUTRIÇÃO DAS MINICEPAS	33
2.4 COLETA DE BROTAÇÕES E PREPARO DAS MINIASTACAS	34
2.5 SOBREVIVÊNCIA DE MINICEPAS E PRODUÇÃO DE MINIASTACAS	35
2.6 SOBREVIVÊNCIA E ENRAIZAMENTO DE MINIASTACAS	36
2.7 MANEJO E FERTILIZAÇÃO DAS MINIASTACAS	37
2.8 EFEITO DO ÁCIDO INDOLBUTÍRICO NO ENRAIZAMENTO DE MINIASTACAS	38
2.9 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS	39
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	40
3.1 SOBREVIVÊNCIA DE MINICEPAS E PRODUÇÃO DE MINIASTACAS	40
3.1.1 Sobrevivência de minicepas	41
3.1.2 Produção de miniestacas em função das coletas	43
3.1.3 Produção de miniestacas em função das estações do ano	48
3.2 SOBREVIVÊNCIA E ENRAIZAMENTO DE MINIASTACAS	54
3.2.1 Sobrevivência e enraizamento de miniestacas em função das coletas	54
3.2.2 Sobrevivência e enraizamento de miniestacas em função das estações do ano	59

3.3 EFEITO DO ÁCIDO INDOLBUTÍRICO NO ENRAIZAMENTO DE MINISTACAS.....	67
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>79</b>
<b>CAPÍTULO II - MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Eucalyptus benthamii</i> Maiden &amp; Cambage x <i>Eucalyptus dunnii</i> Maiden.....</b>	<b>85</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>85</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>86</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>91</b>
2.1 CARACTERIZAÇÃO GERAL DO EXPERIMENTO.....	91
2.2 FONTE DE EXPLANTES.....	91
2.3 COLETA E PREPARO DOS EXPLANTES .....	91
2.4 ESTABELECIMENTO.....	92
2.5 MULTIPLICAÇÃO .....	93
2.6 ALONGAMENTO .....	94
2.7 PREPARO DO MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES AMBIENTAIS .....	94
2.8 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS.....	95
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>96</b>
3.1 ESTABELECIMENTO .....	96
3.2 MULTIPLICAÇÃO .....	99
3.3 ALONGAMENTO .....	103
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>110</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>114</b>
<b>RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>117</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, as florestas plantadas representam um recurso renovável de fundamental importância para atender a demanda global crescente por produtos derivados de biomassa lenhosa (GRATTAPAGLIA, 2007; PIJUT *et al.*, 2007). Fatores como o aumento da competição de mercados tornam necessário o aprimoramento dos serviços prestados, bem como dos produtos fornecidos (WENDLING, 1999). Além disso, a procura por espécies que apresentam madeira de elevada qualidade e rápido crescimento está se tornando cada vez mais freqüente (GRATTAPAGLIA, 2007; SOUZA JUNIOR, 2007).

A formação desse cenário, aliado ao potencial das espécies de *Eucalyptus* em produzir madeira para inúmeras aplicações, notadamente para fins industriais, fez com que esse gênero adquirisse relevância comercial, despertando o interesse de diversas empresas em relação a programas de melhoramento genético, visando o aprimoramento de seus plantios.

As regiões sul e sudeste formam o maior pólo consumidor e exportador de madeira oriunda de plantios florestais. No entanto, as espécies de eucalipto adaptadas às condições climáticas e economicamente importantes para a região sul do Brasil, constituem um grupo muito restrito. O *E. benthamii* e o *E. dunnii* são alternativas para o plantio, principalmente em função da tolerância a geadas. Contudo, existem limitações quanto a produção de sementes e, quando existe disponibilidade, os preços são elevados (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006).

A propagação vegetativa de espécies florestais é uma alternativa para a obtenção de indivíduos que apresentam características genéticas superiores (ELDRIDGE *et al.*, 1994), principalmente em situações onde a semente é um fator limitante (SOUZA JUNIOR; WENDLING, 2003). Devido ao grande impacto gerado no setor florestal, esse conjunto de técnicas de clonagem está sendo foco de inúmeras pesquisas em várias áreas do conhecimento.

Dentre as principais vantagens, a propagação clonal pode maximizar os ganhos em uma única geração, mantendo as características favoráveis, evitando a variabilidade encontrada em árvores obtidas a partir de sementes (GRAÇA; TOTH, 1990; XAVIER; COMÉRIO, 1996; HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000), onde

os ganhos em homogeneidade, produtividade e adaptabilidade, justificam o processo de clonagem (CAMPINHOS *et al.*, 1999).

Nesse sentido, as estratégias de melhoramento para espécies puras podem ser associadas a programas de produção de híbridos e de clonagem, visando produzir, capturar e multiplicar combinações superiores, a fim de aumentar a eficiência dos programas de melhoramento (DESTRO; MONTALVÁN, 1999; TITON *et al.*, 2003). Os materiais genéticos hibridizados podem apresentar maior plasticidade quanto à adaptação aos diferentes sítios florestais e, além disso, podem ser mais produtivos ou apresentarem melhores características da madeira (SILVEIRA *et al.*, 2001; ASSIS; MAFIA, 2007).

A clonagem do *Eucalyptus* vem sendo executada principalmente por meio da miniestaquia, a qual tem sido adotada pela maioria das grandes empresas florestais (ALFENAS *et al.*, 2004), onde os indivíduos são selecionados em função das características silviculturais e tecnológicas do interesse de cada uma. No entanto, em determinadas situações, algumas empresas utilizam a técnica de micropropagação para a produção massal de genótipos selecionados (WATT *et al.*, 2003), ou ainda, para o rejuvenescimento de materiais adultos (XAVIER; COMÉRIO, 1996).

Dentre as principais vantagens da miniestaquia e micropropagação relatadas na literatura, destacam-se: a melhoria na uniformidade das mudas, maior facilidade de controle de doenças e da nutrição, maior produção de brotações e aplicações de concentrações reduzidas de fitorreguladores de crescimento, apontando como importantes ferramentas para a maximização da produção.

A tecnologia de produção de mudas de espécies florestais está em constante desenvolvimento, sendo que novos avanços podem ser esperados a cada ano (CAMPINHOS *et al.*, 1999). O desafio para o setor florestal nos próximos anos não será apenas o de investimentos na área industrial, mas também quanto ao aumento de produtividade pela seleção de novas variedades, sendo que a biotecnologia, por meio da propagação clonal, está contribuindo significativamente para o desenvolvimento do setor florestal brasileiro (ANDRADE, 2001).

Nesse contexto, dada as vantagens da aplicação da propagação vegetativa para o gênero *Eucalyptus*, o presente trabalho teve como enfoque principal testar as técnicas de miniestaquia e micropropagação para a clonagem de genótipos selecionados do híbrido *E. benthamii* x *E. dununii*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O *Eucalyptus*

A família Myrtaceae compõe grande parte da vegetação natural australiana e ilhas adjacentes, desempenhando papel fundamental para a formação de diversos padrões ecológicos (KELLY, 1981; MYERSCOUGH, 1998). Dentre os mais variados membros, essa família inclui o gênero *Eucalyptus*, o qual apresenta mais de 600 espécies, variedades e híbridos naturais, sendo algumas endêmicas a essa região (PRYOR, 1976; BOLAND *et al.*, 1984).

Em razão das diversas espécies de *Eucalyptus* produzirem madeira de importância comercial são utilizadas em grande escala para o estabelecimento de plantações em áreas tropicais e subtropicais do mundo (VILLEGAS; RIVERA, 2002; ALVES; XAVIER; OTONI, 2004), representando mais de 17,8 milhões de hectares de florestas plantadas (ALFENAS *et al.*, 2004). Segundo dados levantados por Moura e Guimarães (2003), estima-se que 90 países usam este gênero em plantios comerciais, destacando-se a Índia, África do Sul, China, Itália, Israel, Argentina, Chile, países Árabes e o Brasil, principalmente destinados para o abastecimento do setor energético e para fins industriais.

Em virtude de apresentarem excelentes características silviculturais, adaptativas e rápido crescimento (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006; JAEGER; ZIGER, 2007) as espécies desse gênero são amplamente plantadas no Brasil (ROCHA; TRUGILHO, 2006; FOELKEL, 2007) nas mais variadas condições de clima e solo (ANDRADE *et al.*, 2003).

Segundo relatório apresentado pela ABRAF (2007), tendo 2006 como ano base, existe cerca de 3,5 milhões de hectares de área plantada de eucalipto no Brasil, apresentado acréscimo de aproximadamente 4% de áreas plantadas em relação ao ano de 2005.

O cultivo destina-se para diversas finalidades, sendo a principal utilização voltada ao abastecimento de matéria-prima para as indústrias de celulose, papel, carvão vegetal, chapas de partículas e fibras (FERREIRA *et al.*, 1997; ROCHA; TOMASELLI, 2002; MAFIA *et al.*, 2005; ROCHA; TRUGILHO, 2006; FOELKEL, 2007; GODOY, 2007; LIMA *et al.*, 2007).

A utilização de espécies provenientes de florestas plantadas tem uma contribuição importante na redução da pressão sobre a utilização de espécies nativas, concorrendo assim para a sua preservação e a dos recursos naturais nelas existentes (ANDRADE *et al.*, 2003; PEDROSA; IWAKIRI; MATOS, 2005; ROCHA; TRUGILHO, 2006). Adicionalmente, o eucalipto pode ser utilizado para produção de óleos na indústria farmacêutica, apicultura e para a formação de quebra-vento (SANTOS; AUER; GRIGOLETTI JUNIOR, 2001). Recentemente, o setor privado demonstrou interesse pelo uso das florestas de eucalipto para fixação de carbono, visando reduzir a concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) na atmosfera (ALFENAS *et al.*, 2004).

No Brasil, estão sendo obtidos ganhos significativos para o gênero *Eucalyptus* através do melhoramento genético (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000), em que a base da silvicultura está na utilização de clones de alta produtividade, os quais são identificados nas avaliações de testes clonais (SILVA *et al.*, 2003; HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2002). Para tanto, as grandes empresas florestais utilizam a técnica de miniestaquia para a clonagem do *Eucalyptus*, sendo essa a técnica de propagação vegetativa mais difundida na atualidade para esse gênero (ALFENAS *et al.*, 2004). Em certos casos, a cultura de tecidos também está sendo adotada para a produção massal de genótipos selecionados (WATT *et al.*, 2003).

Dentre as espécies de eucalipto cultivadas no Brasil, destaca-se o *Eucalyptus grandis*, que é plantado em alta escala na região Sudeste (ROCHA; TOMASELLI, 2002). No entanto, apesar de todos os avanços, existem certas limitações de sua expansão na região sul do Brasil, principalmente devido a ocorrência de temperaturas mais baixas e geadas freqüentes. Esse fato torna importante o desenvolvimento de pesquisas direcionadas para novas espécies e variedades, buscando avaliar o potencial para os mais diversos fins e introduzi-las de acordo com as características de cada ambiente (NISGOSKI; MUÑIZ; KLOCK, 1998).

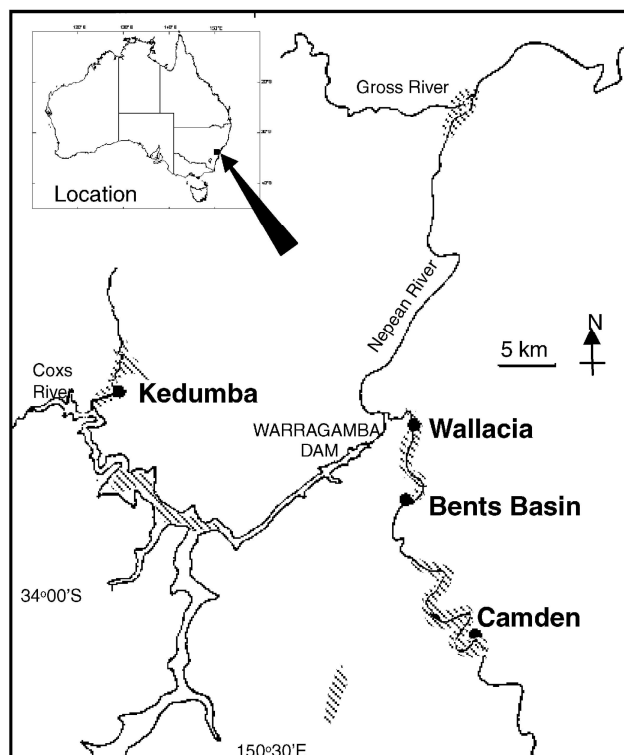
Em regiões onde a incidência de geadas severas compromete o estabelecimento e a adaptação de espécies de *Eucalyptus*, a resistência ao frio é uma das características de maior importância que pode ser introduzida por meio da hibridação (ASSIS; MAFIA, 2007).

Segundo dados levantados por Paludzyszyn Filho, Santos e Ferreira (2006), as espécies de eucalipto economicamente importantes para as condições mais frias do Brasil constituem um grupo muito restrito, e dentre estas, o *E. benthamii* e o *E. dunnii*, apresentam boa aptidão, principalmente no que se refere a produção de madeira para fins energéticos e sólidos madeiráveis. Por ser uma espécie de clima subtropical, Assis e Mafia (2007) sugerem que o *E. benthamii* apresenta-se como boa alternativa como componente de híbridos resistentes ao frio. Adicionalmente, a produção do híbrido interespecífico entre os materiais citados poderá proporcionar benefícios extras, ao associar as vantagens adaptativas e silviculturais das espécies parentais registradas na literatura (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006).

## 2.2 *Eucalyptus benthamii*

O *E. benthamii*, cujo nome comum “Camden White Gum” deriva da cidade de Camden (HALL; BROOKER, 1973), apresenta distribuição natural no litoral oriental de New South Wales, Austrália, com latitude aproximada de 34°00' S e longitude de 150°30' E. A espécie limita-se, principalmente, a sudoeste da cidade de Sydney em planícies aluviais ao longo do Rio Nepean e seus afluentes (HALL; BROOKER, 1973; KELLY, 1982) (Figura 1).





**FIGURA 1** - Distribuição geográfica de *Eucalyptus benthamii* na região de ocorrência natural. Fonte: Butcher, Skinner e Gardiner (2005).

Ocorre preferencialmente nas margens de rios, com altitudes variando de 140 m a 1.000 m. Os solos são rasos a moderadamente profundos (<100 cm) e bem drenados, com valores de pH variando de 5,5 a 6,5. Apresenta melhor desenvolvimento em neossolos flúvicos (solos aluviais) (BENSON; McDOUGALL, 1998; NSW, 2000; TOZER, 2003). A média de precipitação anual varia de 730 mm a 1.010 mm, com regime de chuva no verão e tempo de seca de 3 meses. A média da temperatura anual oscila de 13 °C a 17 °C, com média das temperaturas máximas do mês mais quente entre 26 °C a 30 °C e, média das temperaturas mínimas do mês mais frio de 1 °C a 3 °C (JOVANOVIC; BOOTH, 2002).

De acordo com Hall e Brooker (1973), na área de distribuição natural da espécie, ocorriam em média, de 4 a 10 geadas por ano na localização sul, e de 30 a 40 na localização nordeste. Recentemente, em revisão realizada por Jovanovic e Booth (2002) foi constatado que a espécie ocorre em áreas com temperaturas mínimas do mês mais frio variando de -1 °C a 3 °C, sendo tolerante a geadas e a secas. Contudo, segundo Paludzyszyn Filho, Santos e Ferreira (2006), a temperatura mínima absoluta que o *Eucalyptus benthamii* pode suportar é de até -6 °C, podendo apresentar alterações de acordo com o comportamento adaptativo.

A altura da espécie varia de 30 m a 45 m, apresentando rápido crescimento e excelente capacidade adaptativa em vários sítios (KELLY, 1982; BENSON; McDOUGALL, 1998; KJAER *et al.*, 2004). Na região de distribuição natural, a floração e a frutificação variam consideravelmente entre as diferentes populações, sendo distribuída ao longo do ano. Os botões florais são encontrados todo o ano, exceto em fevereiro. A floração ocorre de março a maio, com flores de coloração branca. Os frutos maduros, de 4 mm a 5 mm de comprimento, podem ser colhidos de junho a dezembro (BENSON; McDOUGALL, 1998; NSW, 2000; GUNN, 2001). Contudo, as sementes dessas populações têm pouca viabilidade, face ao alto grau de endogamia e autofecundação (BUTCHER; SKINNER; GARDINER, 2005).

A ecologia do *E. benthamii* parece estar muito ligada a ciclos de cheias e incêndios. As sementes encontram-se armazenadas, principalmente, no banco de sementes do solo, sendo que, inundações eventuais acompanhadas pela deposição de silte fornecem condições adequadas para a germinação. Na ocorrência de incêndios de baixa intensidade a espécie responde pela emissão de brotações epicórmicas e novos ramos (BENSON; McDOUGALL, 1998; MYERSCOUGH, 1998; NSW, 2000).

Levantamentos recentes apontam que a espécie *E. benthamii* está confinada a uma população de aproximadamente 6.500 árvores no Vale Kedumba e a três populações remanescentes: uma ao longo do Rio Nepean até a Bacia Bents (aproximadamente 300 árvores), Wallacia (nove árvores) e Camden (aproximadamente 30 árvores). A estimativa da idade dos indivíduos que compõem essas populações é de 35 a 200 anos (BUTCHER; SKINNER; GARDINER, 2005), sendo considerada uma espécie de alta longevidade (BENSON; McDOUGALL, 1998).

A área de distribuição da população de *E. benthamii* foi fortemente reduzida devido o aumento das atividades agrícolas, como as executadas no Vale Cox, e pela construção da represa de Warragamba Dam em 1933, visando o abastecimento de água para Sydney, o que inundou grande parte da população original (HALL; BROOKER, 1973; NSW, 2000).

Os principais eventos que ameaçam a espécie devem-se a baixa regeneração natural, concorrência com espécies introduzidas, alterações nos regimes hídricos, incêndios (NSW, 2000; BUTCHER; SKINNER; GARDINER, 2005),

aumento das áreas urbanas e a intensa atividade agrícola na área de ocorrência natural (KJAER *et al.*, 2004).

Na Austrália, *E. benthamii* é listado como uma espécie vulnerável ao processo de extinção com interesse voltado, principalmente, para fins conservacionistas (SEIDLICH; DOUGLAS; OCULUS, 1997; BENSON; McDOUGALL, 1998; NSW, 2000; POTTS; BARBOUR; HINGSTON, 2001; KJAER *et al.*, 2004).

Quanto aos aspectos silviculturais, essa espécie tem apresentado alta taxa de crescimento em testes realizados na Austrália e outros locais do mundo (JOVANOVIĆ; BOOTH, 2002), sendo indicada, principalmente, para regiões de clima temperado. Condições favoráveis ao crescimento são encontradas na África do Sul, China, Brasil (SWAIN; GARDNER, 2004; KJAER *et al.*, 2004; PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006), Chile e Uruguai (KJAER *et al.*, 2004; BOCAGE; ULERY, 2005).

No Brasil, uma das primeiras populações genéticas base de *E. benthamii* foi introduzida pela Embrapa Florestas - CNPF no ano de 1988, em Colombo - PR. Esse povoamento consta de famílias misturadas de sete a dez matrizes da procedência Wentworth Falls (NSW), Austrália (GRAÇA; SHIMIZU; TAVARES, 1999). No ano de 2005, com a finalidade de ampliar a base genética da população de *E. benthamii* existente no Brasil, a Embrapa Florestas importou 36 lotes de sementes na forma de progênies de polinização aberta, e ainda, lotes adicionais formados a partir da mistura de sementes colhidas em árvores pertencentes a duas populações naturais (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006).

Estudos apontam grande probabilidade de uso da espécie para fins industriais e energéticos (HIGA; PEREIRA, 2003; PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006). Entretanto, atualmente, não é aconselhado o seu uso para serraria, pois além das rachaduras do topo das toras e tábuas, apresenta empenamento e rachaduras internas durante a secagem, com índices elevados de contração volumétrica e de coeficiente de anisotropia, mesmo em condições amenas de secagem em temperatura ambiente e a sombra (HIGA; PEREIRA, 2003).

Como produtora de óleos essenciais, Silva, Brito e Silva Junior (2006) observaram que o *E. benthamii* apresentou maior produção no mês de outono, porém, inferior as demais espécies de *Eucalyptus* estudadas, não sendo aconselhado o uso para essa finalidade em virtude do baixo rendimento.

Bocage e Ulery (2005) estudando a caracterização anatômica de *E. benthamii* cultivado no Uruguai, relataram peso específico aparente básico da madeira de  $0,457 \text{ g cm}^{-3}$ , em árvores de seis anos de idade e plantadas em espaçamento de 3 m x 3 m. Esses resultados assemelham-se aos encontrados por Higa e Pereira (2003) e Nisgoski, Muñiz e Klock (1998), os quais relataram densidade básica da madeira de  $0,477 \text{ g cm}^{-3}$ .

Quanto ao crescimento, Higa (1999) e Higa e Pereira (2003) salientam a escassez de informações, assim como assuntos pertinentes a propagação vegetativa. Um dos fatores, segundo Higa e Pereira (2003), relaciona-se por ser uma espécie considerada em extinção na sua região de ocorrência natural e, a aquisição de material genético suficiente para o desenvolvimento de um programa de melhoramento genético é dificultada.

O *E. benthamii* apresentou bom comportamento ao ser manejado no sistema de talhadia nas províncias de Mpumalanga e KwaZulu, África do Sul, ambas regiões de clima frio. Devido ao bom desempenho silvicultural, a espécie foi apontada como alternativa potencial para a produção de celulose (LITTLE; GARDNER, 2003).

No Brasil a procedência Wentworth Falls (NSW), introduzida pela Embrapa Florestas, na região de Colombo - PR, apresentou alta resistência à geada, rápido crescimento, boa forma de fuste e alta homogeneidade do talhão (GRAÇA; SHIMIZU; TAVARES, 1999), sendo que aos 8 anos de idade, estimou-se altura média de 21,7 m e DAP médio de 18,2 cm (HIGA; PEREIRA, 2003). Em plantio experimental realizado em Guarapuava - PR, Paludzyszyn Filho, Santos e Ferreira (2006) também constataram forte tolerância do *E. benthamii* a geada, sendo essa superior ao *E. dunnii*.

Essas características tornaram o *E. benthamii* uma excelente opção para reflorestamentos em regiões de clima frio, principalmente em localidades onde ocorre geadas freqüentes e severas, como no sul do Brasil (GRAÇA; SHIMIZU; TAVARES, 1999; HIGA; PEREIRA, 2003; PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006).

Quanto a propagação vegetativa da espécie, um dos primeiros estudos no Brasil foi realizado por Graça, Shimizu e Tavares (1999), o qual foi baseado na técnica de estaquia. Os autores coletaram brotações de cepas de *E. benthamii* aos 90 dias após o corte das árvores. Da porção mediana e basal das brotações, foram confeccionadas as estacas de tamanho de 15 cm e contendo um par de folhas

reduzidas a metade da sua área. Logo após, submeteram as estacas ao tratamento com ácido indolbutírico (AIB) na concentração de  $6.000 \text{ mg L}^{-1}$  durante 10 segundos e, estaquearam-nas em tubetes contendo vermiculita de textura média. Após 60 dias em condições de casa de vegetação com nebulização intermitente, os autores observaram que durante a estaquia de outono ocorreu enraizamento médio de 26,3% e na primavera enraizamento de 31,2%, concluindo que o enraizamento foi baixo, o que pode ser um fator limitante caso a técnica seja empregada em plantios comerciais ou em programas de melhoramento genético. Complementam, ainda, que para a viabilidade da técnica, existe a necessidade de selecionar matrizes com alta capacidade de enraizamento e desenvolver tratamentos que otimizem o enraizamento, caso estes ainda sejam necessários.

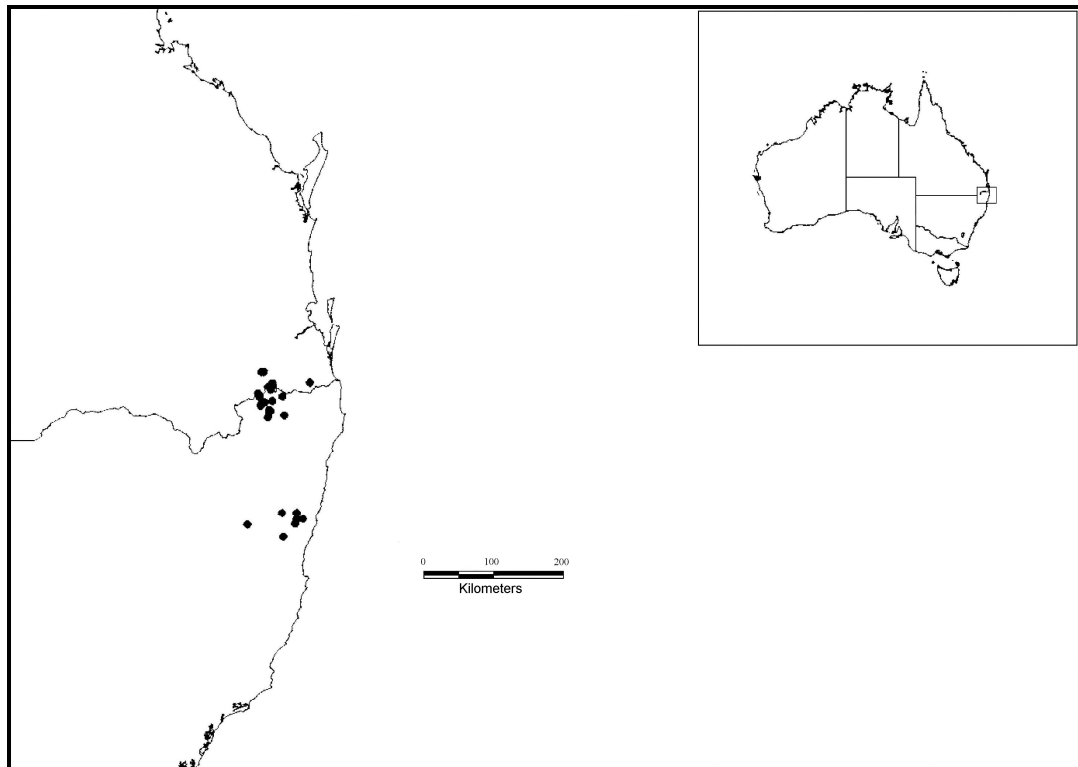
Um possível efeito dos baixos índices de enraizamento observado em espécies de *Eucalyptus* indicadas para o plantio em regiões subtropicais, segundo Assis e Mafia (2007), refere-se a elevada recalcitrância aos processos rizogênicos ao comparar com espécies de *Eucalyptus* de clima tropical, dificultando o uso dessas fontes genéticas em programas clonais.

Como alternativa de clonagem, Cunha, Wendling e Souza Junior (2005) estudaram a miniestaquia do *E. benthamii*, comparando o manejo do minijardim clonal em sistema de tubete e em cultivo hidropônico do tipo canaletão. Após cinco coletas de miniestacas, observaram sobrevivência de minicepas em torno de 88% para o sistema de canaletão, não existindo diferença significativa em relação ao sistema de tubete. Entretanto, no sistema hidropônico a produção de miniestacas foi praticamente o dobro, sendo recomendado o manejo do minijardim clonal em sistema hidropônico do tipo canaletão como alternativa mais promissora para a produção de propágulos vegetativos da espécie.

### 2.3 *Eucalyptus dunnii*

O *E. dunnii*, “Dunn’s White Gum”, apresenta distribuição natural limitada a região de Coffs Harbour, nordeste de New South Wales e sul de Queensland, Austrália. Sua distribuição é descontínua com duas populações, aparentemente, disjuntas (HILLIS; BROWN, 1978; KELLY, 1982; BOLAND *et al.*, 1984) (Figura 2). A espécie é conhecida pela tolerância à geadas, sendo cultivada comercialmente na

América do Sul, principalmente para a produção de celulose (JOVANOVIĆ; ARNOLD; BOOTH, 2000; JOVANOVIĆ; BOOTH, 2002).



**FIGURA 2** - Distribuição geográfica de *Eucalyptus dunnii* na região de ocorrência natural. Fonte: Jovanovic, Arnold e Booth (2000).

Devido a restrita área de ocorrência natural é classificada como uma espécie rara, porém cada vez mais importante em plantios comerciais (JOVANOVIĆ; ARNOLD; BOOTH, 2000; THINLEY *et al.*, 2005).

Na área de ocorrência natural, a precipitação média anual varia de 845 mm a 1.950 mm com regime de chuvas no verão e período de 2 meses de estação seca. A temperatura média anual oscila de 14 °C a 18 °C, a temperatura máxima do mês mais quente de 24 °C a 29 °C, e a temperatura mínima do mês mais frio de -1 °C a 7 °C. A temperatura mínima absoluta nessa região varia de -5 °C a 10 °C (JOVANOVIĆ; ARNOLD; BOOTH, 2000; JOVANOVIĆ; BOOTH, 2002).

Apresenta bom desenvolvimento em clima tropical e subtropical (POTTS; BARBOUR; HINGSTON, 2001), podendo atingir até 40 m de altura (HILLIS; BROWN, 1978), em altitudes que variam entre 300 m a 750 m, apresentando preferência por solos férteis basálticos ou aluviais (BOLAND *et al.*, 1984).

A espécie apresenta um papel significativo em programas de reflorestamento, com maior número de indicações favoráveis para o crescimento sob clima temperado, sendo aconselhado o seu plantio para fins comerciais na Austrália, África do Sul, China, América Central e do Sul (JOVANOVIC; ARNOLD; BOOTH, 2000; PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006). Particularmente, no Brasil e Argentina, encontram-se a maioria das plantações relatadas de *E. dunnii* (JOVANOVIC; ARNOLD; BOOTH, 2000).

Jovanovic e Booth (2002) ressaltam que o *E. dunnii* apresenta bom comportamento em áreas mais frias. Paludzyszyn Filho, Santos e Ferreira (2006) indicam o plantio da espécie em regiões com temperaturas mínimas absolutas de até -5 °C, sob condições de aclimação prévia por gradual redução de temperatura na estação fria, suportando até 22 geadas anuais.

No entanto, Higa *et al.* (2000) analisaram em Campo do Tenente - PR, o comportamento do *E. dunnii* sob geada severa ocorrida no ano de 1994, com temperatura mínima registrada de -6,5 °C. Os autores observaram que a geada não afetou a sobrevivência das progênes, porém reduziu a altura da maioria das plantas e causou níveis variados de danos. Na região de Guarapuava - PR, em plantios experimentais sob efeito de geada de alta intensidade, foi registrado atraso no desenvolvimento da espécie em relação ao *E. benthamii*, estimando-se perda de produção em torno de 50 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006). Esses fatos evidenciaram que a espécie não é tolerante, mas sim, resistente a geadas (HIGA *et al.*, 2000; SANTOS; AUER; GRIGOLETTI JUNIOR, 2001).

Quanto ao crescimento, em New South Wales, Austrália, o *E. dunnii* apresentou área basal média de 30 m<sup>2</sup> ha<sup>-1</sup>, aos 18 anos de idade, quando cultivada em sítios com diferentes condições topográficas (TURNER; GESSEL; LAMBERT, 1999). Barth *et al.* (2003) estudando modelos de crescimento e produção de *Eucalyptus dunnii* na região de Misiones, Argentina, observaram que os tratamentos correspondentes a 275 e 137 árvores por hectare alcançaram um DAP médio de 26,45 cm e 30,53 cm, respectivamente, aos 6 anos de idade.

No Brasil, na região da Mata Pernambucana - PE, o *E. dunnii* apresentou 100% sobrevivência em primeiro ano de avaliação, além de ter apresentado os melhores desempenhos em altura (5,53 m) e diâmetro (5,76 cm), juntamente com *E. citriodora*, *E. urophylla*, *E. camaldulensis*, *E. saligna* e *E. grandis* (COUTINHO *et al.*, 2004).

Em Ponta Grossa - PR, Andrade *et al.* (2003) estudaram o efeito da aplicação de fósforo e resíduo de celulose no crescimento de um povoamento de *E. dunnii* aos 6 anos de idade, o qual foi estabelecido em espaçamento 3 m x 2 m em um LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico típico. A espécie respondeu positivamente em função da fertilização fosfatada e aplicação de resíduo de celulose, sendo que o incremento médio em volume real variou de 23 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> a 45 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>.

A madeira apresenta características adequadas para a produção de celulose (FERREIRA *et al.*, 1997; JOVANOVIĆ; ARNOLD; BOOTH, 2000), e potencialidade para a confecção de chapas de madeira-cimento (LATORRACA; IWAKIRI, 2000). Jaeger e Ziger (2007) também observaram que os painéis compensados constituídos de *E. dunnii* apresentaram os melhores resultados, ressaltando a viabilidade de uso da madeira para esse fim.

Para o emprego em serraria, foi registrado que o sistema de desdobro visando a obtenção de tábuas com faces radiais apresentou as melhores condições para o uso de peças para fins de beneficiamento industrial, porém apresenta defeitos durante o processo de secagem (ROCHA; TRUGILHO, 2006), fato esse, semelhante as demais espécies do gênero *Eucalyptus* (SEVERO, 2000), pois a madeira apresenta elevada variabilidade (TRUGILHO *et al.*, 2004).

Pereira *et al.* (1986) relataram densidade básica média de 0,444 g cm<sup>-3</sup> para *E. dunnii* aos quatro anos e meio de idade, em plantio realizado em Colombo - PR no espaçamento de 3 m x 2 m. Os autores concluíram que a espécie produziu madeira de qualidade inferior como fonte de energia, ao comparar com *E. viminalis* e bracatinga (*Mimosa scabrella*). Porém, os altos níveis de produtividade observados compensaram esse resultado e, classificaram-na como uma das principais alternativas da região sul do Brasil para a produção de madeira para fins energéticos.

Quanto a tecnologia de produção de mudas da espécie a partir de sementes, foi registrada importante associação com micorrizas. Os trabalhos reportados por Alves *et al.* (2001), Giachini, Souza e Oliveira (2004), Souza, Silva Filho e Oliveira (2004) e Chen, Liu e Dell (2007) evidenciam efeitos positivos no crescimento e a nível nutricional, principalmente quanto a absorção do fósforo.

Contudo, ao tratar da propagação vegetativa, a espécie apresenta certas limitações. Segundo Paludzyszyn Filho, Santos e Ferreira (2006) algumas espécies



de *Eucalyptus*, como no caso o *E. dunnii*, apresentam dificuldades para a propagação vegetativa devido ao baixo índice de enraizamento. Além disso, a maioria das espécies resistentes ao frio apresentam recalcitrância ao enraizamento (ASSIS; MAFIA, 2007), fato esse que pode dificultar ainda mais a clonagem.

Graça e Toth (1990) observaram que a espécie apresentou alta capacidade de rebrota, com 94,3% de cepas brotadas, o que potencializa o uso dos brotos como fonte de material rejuvenescido para estaquia. No entanto, o uso da estaquia como alternativa de clonagem para *E. dunnii* é dificultada, pois além da baixa porcentagem de enraizamento, apresenta alta variabilidade na capacidade rizogênica entre as procedências e até entre indivíduos da mesma procedência. A fim de acelerar os programas de melhoramento da espécie, os autores recomendam a seleção de matrizes que apresentam alta capacidade de enraizamento (COOPER; GRAÇA, 1987; COOPER; GRAÇA, 1994).

Estudos têm indicado que a propagação vegetativa via técnica de miniestaquia pode ser viável para a produção de mudas de *E. dunnii*, sendo que esse método vem sendo empregado com sucesso para a produção massal de mudas de espécies de eucaliptos tropicais (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS, 2005).

Souza Junior e Wendling (2003) testaram a técnica de miniestaquia como alternativa de clonagem para *E. dunnii*, via material seminal. Os autores observaram alto percentual de sobrevivência das mudas em área de pleno sol, cerca de 90%, não sendo constatado efeito significativo das concentrações de AIB (0, 1.500, 3.000 e 6.000 mg L<sup>-1</sup>). Os autores atribuíram o fato da ausência de resposta da espécie à aplicação do fitorregulador em função do alto grau de juvenilidade do material.

Rosa (2006) estudou o efeito da adubação nitrogenada e substratos na miniestaquia de *E. dunnii*. As minicepas foram produzidas por sementes e cultivadas em minijardim clonal sob sistema de tubetes (55 cm<sup>3</sup>). A produção média de miniestacas por minicepa foi igual a 2,82 unidades. Além disso, as minicepas que receberam solução nutritiva contendo a forma amoniacal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) apresentaram melhor desenvolvimento, maior produtividade de brotos e de biomassa, melhor estado nutricional e maior sobrevivência das miniestacas, conferindo a técnica de miniestaquia uma alternativa viável para a clonagem da espécie, com taxa de enraizamento variando de 15,0% a 47,5%.

## 2.4 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA

A propagação vegetativa ou assexual consiste em obter mudas geneticamente idênticas a planta-matriz a partir de diferentes órgãos vegetativos, fato esse, embasado na potencialidade dos tecidos de se regenerarem pelo processo de divisão celular conhecido como mitose (HARTMANN *et al.*, 2002).

A propagação vegetativa está em pleno desenvolvimento, e proporcionando avanços significativos no campo do melhoramento genético (WATT *et al.*, 2003), o que contribui para a clonagem florestal ganhar reconhecimento em nível mundial (JOSHI *et al.*, 2003).

A clonagem constitui o processo ideal para maximizar os benefícios da hibridação no contexto da formação de povoamentos altamente produtivos para as finalidades industriais. Além disso, a grande diferenciação entre as espécies, em termos de crescimento e propriedades tecnológicas da madeira é um fator importante na produção de combinações complementares, capazes de proporcionar ganhos simultâneos em crescimento e qualidade da madeira. O aproveitamento comercial da heterose em híbridos de *Eucalyptus*, por intermédio da clonagem, é um dos grandes responsáveis pela rápida evolução da produtividade florestal nos últimos anos e é um dos exemplos mais bem sucedidos do uso de híbridos em espécies florestais (ASSIS; MAFIA, 2007).

Segundo Eldridge *et al.* (1994), os primeiros sucessos na produção de estacas enraizadas de *Eucalyptus* foram obtidos pelos pesquisadores Fielding e Pryor no ano de 1948, em Camberra, Austrália. O processo baseava-se em acondicionar brotações juvenis em casa de vegetação com sistema de nebulização.

No ano de 1950, o engenheiro florestal francês Bouvier no Marrocos descobriu, por acaso, a possibilidade de propagar massivamente *Eucalyptus camaldulensis*. Naquela época era comum a realização de podas em mudas produzidas por sementes para promover maior uniformidade e rusticidade. Durante o manejo era realizada a remoção de brotações terminais e galhos laterais, os quais continham alguns pares de folhas. Algumas dessas brotações que foram descartadas entre as mudas se misturaram ao solo e, após alguns dias, sob condições de alta umidade, foi observada formação de raízes (ELDRIDGE *et al.*, 1994).

Após essa observação, a técnica foi aprimorada e, entre os anos de 1964 e 1973 na República Popular do Congo, os pesquisadores do Centro Técnico de Florestas Tropicais (CTFT) adotaram a técnica de estaquia para clonagem de plantas adultas, dando início aos primeiros plantios clonais e difundindo a tecnologia para a cultura de *Eucalyptus* (ELDRIDGE *et al.*, 1994).

No Brasil a propagação vegetativa para o *Eucalyptus* foi introduzida no final da década de 70, pelos engenheiros florestais Edgard Campinhos e Yara Ikemori (CAMPINHOS; IKEMORI<sup>1</sup>, 1983, *apud* ALFENAS *et al.*, 2004), onde atualmente, é uma técnica adotada por várias empresas florestais (ASSIS; MAFIA, 2007), principalmente, como estratégia na melhoria da produtividade e qualidade das florestas (XAVIER; COMÉRIO, 1996).

A fundamentação dessa técnica está baseada na seleção de clones de alta produtividade, que são normalmente identificados nas avaliações de testes clonais para, posteriormente, proceder a propagação clonal massal (SILVA *et al.*, 2003; WENDLING; XAVIER, 2003).

De modo geral, as vantagens da propagação vegetativa estão na uniformidade dos plantios, resistências a doenças, adaptações dos clones específicos para determinados sítios e aumento da produção de madeira em quantidade e qualidade desejáveis para determinados fins, em comparação com plantios oriundos de mudas produzidas por sementes (ELDRIDGE *et al.*, 1994; XAVIER; COMÉRIO, 1996; ALFENAS *et al.*, 2004). Adicionalmente, pode-se obter a fixação de genótipos selecionados, facilidade de propagação, antecipação do período de florescimento, combinação de mais de um genótipo em uma planta-matriz e maior controle das fases de desenvolvimento (HARTMANN *et al.*, 2002).

Apesar de todas as vantagens proporcionadas pela propagação vegetativa, existem certos fatores que limitam a sua aplicação. A dificuldade de enraizamento de árvores adultas, o efeito da topófise (efeito da posição onde foram coletados os propágulos), variação entre clones quanto ao enraizamento (HARTMANN *et al.*, 2002; ELDRIDGE *et al.*, 1994) e a heterogeneidade entre as plantas em plantios comerciais de um mesmo clone, conhecida como efeito “C” (XAVIER; COMÉRIO, 1996; HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000), constituem alguns problemas a serem superados.

---

<sup>1</sup> CAMPINHOS, E. J.; IKEMORI, Y. K. Nova técnica para produção de mudas de essências florestais. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais - IPEF**, v. 23, p. 47-52, 1983.

Dentre os principais fatores influentes na promoção dos processos rizogênicos em propágulos vegetativos, a atividade de enzimas (BASAK; DAS; DAS, 2000), o efeito da sazonalidade (FORD *et al.*, 2002), temperatura, tipos de estacas e substrato, luminosidade, umidade, oxigênio, nutrientes minerais (HARTMANN *et al.*, 2002; ZUFFELLATO-RIBAS; RODRIGUES, 2001a), constituição genética da planta-matriz, presença de inibidores, aspectos nutricionais, fotoperíodo (ALFENAS *et al.*, 2004), assim como, a expressão de determinados genes (DAI; CHENG; SARGENT, 2004; DEAN; CASSON; LINDSEY, 2004) exercem papel fundamental nessa etapa.

Diversos trabalhos relatam a influência de fitorreguladores para a indução dos processos rizogênicos em *Eucalyptus* (WENDLING *et al.*, 2000; ZUFFELLATO-RIBAS; RODRIGUES, 2001b; LUCKMAN; MENARY, 2002; SOUZA JUNIOR; WENDLING, 2003; TITON *et al.*, 2003; FOGAÇA; FETT-NETO, 2005; WENDLING; XAVIER, 2005b; ALMEIDA *et al.*, 2007; ALMEIDA; XAVIER; DIAS, 2007), sendo que o ácido indolbutírico (AIB) é um dos fitorreguladores mais amplamente utilizados, em virtude da sua maior estabilidade química em comparação com o ácido indolacético (AIA) (GIANFAGNA, 1995).

Além disso, o estado de maturação do material a ser propagado (ontogenia), o qual apresenta um grande efeito na capacidade de propagação e, subsequente crescimento dos propágulos originados de estacas ou da cultura de tecidos, também é destacado como condicionante aos processos de clonagem (ELDRIDGE *et al.*, 1994; WENDLING; XAVIER, 2001; SWAMY; PURI; SINGH, 2002; WENDLING; XAVIER, 2003; WENDLING; XAVIER, 2005a).

Higashi, Silveira e Gonçalves (2000) salientam que as técnicas para manter ou reverter a juvenilidade são a “chave” para o sucesso de qualquer programa de melhoramento. Para isso, Graça e Toth (1990) destacam que o uso de brotações oriundas de touças constitui a fonte de material rejuvenescido de maior disponibilidade para a preparação de um grande número de estacas. Entretanto, apesar da evolução das técnicas para maximizar o enraizamento de espécies de *Eucalyptus*, os fundamentos biológicos da formação de raízes adventícias não estão bem elucidados (ALFENAS *et al.*, 2004).

Quanto à aplicabilidade para a o gênero *Eucalyptus*, a propagação clonal geralmente é realizada pela macropropagação ou pela micropropagação. A macropropagação envolve métodos convencionais, como a estaquia, miniestaquia e

enxertia, enquanto que dentro da cultura de tecidos, a micropropagação é a técnica mais utilizada (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000; ALFENAS *et al.*, 2004).

A estaquia constituiu um marco na evolução da produção de mudas de espécies florestais, principalmente para o gênero *Eucalyptus*, a qual permitiu o crescimento da silvicultura clonal de forma intensiva em diversas partes do mundo (ALMEIDA *et al.*, 2007). Devido ao impacto no setor florestal, essa técnica assumiu posição de destaque e despertou o interesse das empresas e pesquisadores, com conseqüente busca de aprimoramentos e inovações tecnológicas (TITON *et al.*, 2003).

Entretanto, alguns materiais vegetativos apresentam dificuldades de propagação via técnica de estaquia, principalmente relacionadas ao enraizamento de árvores adultas, baixo índice de enraizamento em certos clones e a baixa qualidade do sistema radicial, sendo necessário à execução de outros métodos de propagação vegetativa a fim de contornar esses problemas.

Com o avanço das pesquisas, a partir da década de 90 surgiu a técnica de miniestaquia. Esse método de propagação vegetativa proporcionou controle mais intensivo dos fatores influentes, tornando possível clonar comercialmente, genótipos de difícil enraizamento (ALFENAS *et al.*, 2004).

Da mesma forma, a micropropagação tem se apresentado como uma ferramenta de grande utilidade para a produção de mudas comerciais ou matrizes doadoras de estacas ou miniestacas (DEL PONTE *et al.*, 2001). Essa técnica geralmente é utilizada para promover o rejuvenescimento do tecido vegetal (ALFENAS *et al.*, 2004), contudo, muitas empresas florestais utilizam os sistemas de cultura de tecidos para propagar massivamente genótipos selecionados por sucessivas gerações, como no caso de materiais hibridizados (WATT *et al.*, 2003).

## REFERÊNCIAS

- ABRAF - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF**: ano base 2006. Brasília, 2007. 80 p.
- ALFENAS, A. C. *et al.* **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 442 p.
- ALMEIDA, F. D. *et al.* Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 455-463, 2007.
- ALMEIDA, F. D. de; XAVIER, A.; DIAS, J. M. M. Propagação vegetativa de árvores selecionadas de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. por estaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 445-453, 2007.
- ALVES, J. R. *et al.* Efeito de inoculante ectomicorrízico produzido por fermentação semi-sólida sobre o crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 307-313, 2001.
- ALVES, E. C. S. de C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese *in vitro* a partir de explante caulinar na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden x *E. urophylla* S. T. Blake. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 5, p. 643-653, 2004.
- ANDRADE, A. **Avaliação de parâmetros que influenciam a transformação genética do *Eucalyptus grandis* via *Agrobacterium***. 94 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas) – Setor de Ciências Agrárias, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2001.
- ANDRADE, G. de C. *et al.* Efeitos da adubação fosfatada e da aplicação de resíduo de celulose no crescimento de *Eucalyptus dunnii*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 47, p. 43-54, 2003.
- ASSIS, T. F. de; MAFIA, R. G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p. 93-121.
- BARTH, S. R. *et al.* Modelos de crecimiento y producción de *Eucalyptus dunnii* (Maid.) en la zona de Garuhapé, Misiones. In: DÉCIMAS JORNADAS TÉCNICAS FORESTALES Y AMBIENTALES, 2003, Eldorado. **ACTAS...** Misiones, Argentina: Facultad de Ciencias Forestales, UnaM-EEA, Montecarlo, INTA. 2003. Disponível em: < <http://www.inta.gov.ar/montecarlo/INFO/documentos/forestales/barthmodelosdunii.pdf>>. Acesso em: 15/10/2007.
- BASAK, U. C.; DAS, A. B.; DAS, P. Rooting response in stem cuttings from five species of mangrove trees: effect of auxins and enzyme activities. **Marine Biology**, v. 136, n. 1, p. 185-189, 2000.
- BENSON, D.; McDOUGALL, L. Ecology of Sydney plant species: part 6 dicotyledon family Myrtaceae. **Cunninghamia**, Sydney, v. 5, n. 4, p. 809-987, 1998.

BOCAGE, I.; ULERY, A. Caracterización anatómica de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage cultivado en Uruguay. In: JORNADA FORESTAL: VISITA A ENSAYOS DE SILVICULTURA Y MEJORAMIENTO DE PINUS Y EUCALIPTOS. 2., 2005, Colonvade. **ACTAS...** Colonvade: INIA Tacuarembó - Estación Experimental del Norte, Programa Nacional Forestal, Facultad de Agronomía - UDELAR. 2005. p. 19-21. Disponível em: < [http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/tb/ad/2005/ad\\_416.pdf](http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/tb/ad/2005/ad_416.pdf)>. Acesso em: 22/10/2007.

BOLAND, D. J. *et al.* **Forest trees of Australia**. Melbourne: Nelson/CSIRO, 1984. 687 p.

BUTCHER, P. A.; SKINNER, A. K.; GARDINER, C. A. Increased inbreeding and inter-species gene flow in remnant populations of the rare *Eucalyptus benthamii*. **Conservation Genetics**, v. 6, n. 2, p. 213-226, 2005.

CAMPINHOS, E. N. *et al.* Hidrojardim clonal Champion: uma otimização na produção de mudas de eucalipto. **Silvicultura**, São Paulo, v. 19, n. 80, p. 42-46, 1999.

CHEN, Y. L.; LIU, S.; DELL, B. Mycorrhizal status of *Eucalyptus* plantations in south China and implications for management. **Mycorrhiza**, v. 17, n. 6, p. 527-535, 2007.

COOPER, M. A.; GRAÇA, M. E. C. **Perspectivas para a maximização de enraizamento de estacas de *Eucalyptus dunnii* Maid.** Curitiba, PR: EMBRAPA/CNPQ, 1987. 9 p. (Circular Técnica, 12).

COOPER, M. A.; GRAÇA, M. E. C. **Enraizamento de estacas de *Eucalyptus dunnii* Maiden.** Colombo, PR: EMBRAPA/CNPQ, 1994. 15 p. (Circular Técnica, 22).

COUTINHO, J. L. B. *et al.* Avaliação do comportamento de espécies de *Eucalyptus* spp. na Zona da Mata Pernambucana. I: resultados do primeiro ano - 2001. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 6, p. 771-775, 2004.

CUNHA, A. C. M. C. M. da; WENDLING, I.; SOUZA JUNIOR, L. Produtividade e sobrevivência de minicepas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage em sistema de hidroponia e em tubete. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 3, p. 307-310, 2005.

DAI, W.; CHENG, Z. M.; SARGENT, W. A. Expression of the *roB* gene enhances adventitious root formation in hardwood cuttings of aspen. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 40, n. 4, p. 366-370, 2004.

DEAN, G.; CASSON, S.; LINDSEY, K. KNAT6 gene of *Arabidopsis* is expressed in roots and is required for correct lateral root formation. **Plant Molecular Biology**, v. 54, n. 1, p. 71-84, 2004.

DEL PONTE, E. M. *et al.* Multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus* subsp. *globulus* Labill. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 1-8, 2001.

DESTRO, D.; MONTALVÁN, R. Considerações gerais sobre hibridação em autógamias. In: DESTRO, D.; MONTALVÁN, R. (Org.). **Melhoramento genético de plantas**. Londrina: Editora da UEL, 1999. p. 201-205.

ELDRIDGE, K. *et al.* Mass vegetative propagation. In: ELDRIDGE, K. *et al.* **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon Press, 1994. p. 228-246.

FERREIRA, G. W. *et al.* Qualidade da celulose kraft-antraquinona de *Eucalyptus dunnii* plantado em cinco espaçamentos em relação ao *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 7, n. 1, p. 41-63, 1997.

FOELKEL, C. As plantações de florestas no Brasil. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p. 13-24.

FOGAÇA, C. M.; FETT-NETO, A. G. Role of auxin and its modulators in the adventitious rooting of *Eucalyptus* species differing in recalcitrance. **Plant Growth Regulation**, v. 45, n. 1, p. 1-10, 2005.

FORD, Y. Y. *et al.* Adventitious rooting: examining the role of auxin in an easy- and a difficult-to-root plant. **Plant Growth Regulation**, v. 36, n. 2, p. 1-11, 2002.

GIACHINI, A. J.; SOUZA, L. A. B.; OLIVEIRA, V. L. Species richness and seasonal abundance of ectomycorrhizal fungi in plantations of *Eucalyptus dunnii* and *Pinus taeda* in southern Brazil. **Mycorrhiza**, v. 14, n. 6, p. 375-381, 2004.

GIANFAGNA, T. Natural and synthetic growth regulators and their use in horticultural and agronomic crops. In: DAVIS, J. (Ed.). **Plant hormones physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2<sup>nd</sup> Edition, 1995. p. 751-773.

GODOY, T. G. **Características de crescimento e eficiência de utilização de fósforo em plantas jovens de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake**. 44 f. Dissertação (Mestrado em Floresta de Produção) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

GRAÇA, M. E. C.; TOTH, V. B. dos R. Rebrotas de *Eucalyptus dunnii*: a influência da altura, diâmetro e procedência no vigor das brotações. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 20, p. 49-57, 1990.

GRAÇA, M. E. C.; SHIMIZU, J. Y.; TAVARES, F. R. Capacidade de rebrotas e de enraizamento de *Eucalyptus benthamii*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 39, p. 135-138, 1999.

GRATTAPAGLIA, D. Aplicações operacionais de marcadores moleculares. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p. 175-200.

GUNN, B. **Australian tree seed centre: operations manual**. Canberra, Australia: PNM Editorial Publications/CSIRO Forestry and Forest Products, 2001. 150 p.

HALL, N.; BROOKER, I. **Camden White Gum: *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage**. Canberra: Department of National Development Forestry and Timber Bureau, 1973. 4 p. (Forest Tree Series, 57).

HARTMANN, H. T. *et al.* **Plant propagation: principles and practices**. 7<sup>th</sup> Edition, New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880 p.



HIGA, R. C. V. Aspectos ecológicos e silviculturais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 38, p. 121-123, 1999.

HIGA, R. C. V. *et al.* Resistência e resiliência a geadas em *Eucalyptus dunnii* Maiden plantados em Campo Tenente, PR. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 40, p. 67-76, 2000.

HIGA, R. C. V.; PEREIRA, J. C. D. **Usos potenciais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage**. Colombo: Embrapa Florestas - CNPF, 2003. 4 p. (Comunicado Técnico, 100).

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. de A.; GONÇALVES, A. N. Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais - IPEF**, 2000. 11 p. (Circular Técnica IPEF, 192).

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. de A.; GONÇALVES, A. N. Nutrição e adubação em minijardim clonal hidropônico de *Eucalyptus*. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais - IPEF**, 2002. 21 p. (Circular Técnica IPEF, 194).

HILLIS, W. E.; BROWN, A. G. ***Eucalyptus for wood production***. Australia: CSIRO, 1978. 434 p.

JAEGER, P.; ZIGER, M. Avaliação das propriedades mecânicas de painéis compensados de *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus dunnii*/*Pinus taeda*. **Cerne**, Lavras, v. 13, n. 3, p. 329-338, 2007.

JOSHI, I. *et al.* *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F<sub>1</sub> hybrid (*Eucalyptus tereticornis* Sm. x *E. grandis* Hill ex Maiden). **Silvae Genetica**, v. 52, n. 3/4, p. 110-113, 2003.

JOVANOVIĆ, T.; ARNOLD, R.; BOOTH, T. Determining the climatic suitability of *Eucalyptus dunnii* for plantations in Australia, China and Central and South America. **New Forests**, v. 19, n. 3, p. 215-226, 2000.

JOVANOVIĆ, T.; BOOTH, T. H. **Improved species climatic profiles**. Australia: Union Offset Printing: Joint Venture Agroforestry Program, Rural Industries Research and Development Corporation, 2002. 68 p.

KELLY, S. ***Eucalypts***. Singapore: Australia: Thomas Nelson, v. 1, 1981. 82 p.

KELLY, S. ***Eucalypts***. Singapore: Australia: Thomas Nelson, v. 2, 1982. 76 p.

KJAER, E. *et al.* Strategies for conservation of forest genetic resources. Conservation of *Eucalyptus benthamii*: an endangered eucalypt species from eastern Australia. In: FAO, FLD, IPGRI. **Forest genetic resources conservation and management: overview, concepts and some systematic approaches**. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute, v. 1, 2004. p. 5-24.

LATORRACA, J. V. de F.; IWAKIRI, S. Efeito do tratamento das partículas de *Eucalyptus dunnii* (Maid.), da variação da relação madeira-cimento e do uso de aditivos sobre as propriedades físicas e mecânicas de chapas de madeira-cimento. **Cerne**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 68-76, 2000.

LIMA, C. K. P. *et al.* Características anatômicas e química da madeira de clones de *Eucalyptus* e sua influência na clonagem. **Cerne**, Lavras, v. 13, n. 2, p. 123-129, 2007.

LITTLE, K. M.; GARDNER, R. A. W. Coppicing ability of 20 *Eucalyptus* species grown at two high-altitude sites in South Africa. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 2, n. 33, p. 181-189, 2003.

LUCKMAN, G. A.; MENARY, R. C. Increased root initiation in cuttings of *Eucalyptus nitens* by delayed auxin application. **Plant Growth Regulation**, v. 38, n. 1, p. 31-35, 2002.

MAFIA, R. G. *et al.* Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 843-851, 2005.

MOURA, V. P. G.; GUIMARÃES, D. P. **Produção de mudas de *Eucalyptus* para o estabelecimento de plantios florestais**. Brasília: Embrapa, 2003. 9 p. (Comunicado Técnico, 85).

MYERSCOUGH, P. J. Ecology of Myrtaceae with special reference to the Sydney region. **Cunninghamia**, v. 5, n. 4, p. 787-807, 1998.

NISGOSKI, S.; MUÑIZ, G. I. B. de; KLOCK, U. Caracterização anatômica da madeira de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 8, n. 1, p. 67-76, 1998.

NSW - NATIONAL PARKS & WILDLIFE SERVICE. **Threatened species information: *Eucalyptus benthamii*** Maiden and Cabbage. Hurstville: National Parks & Wildlife Service, 2000. 3 p.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. dos **Considerações sobre o plantio de *Eucalyptus dunnii* no estado do Paraná**. Colombo: Embrapa Florestas - CNPF, 2005. 7 p. (Comunicado Técnico, 141).

PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. dos; FERREIRA, C. A. **Eucaliptos indicados para plantio no Estado do Paraná**. Colombo: Embrapa Florestas - CNPF, 2006. 45 p. (Documentos, 129).

PEDROSA, A. de L.; IWAKIRI, S.; MATOS, J. L. M. de Produção de vigas estruturais em perfil “I” com painéis de madeira reconstituída de *Pinus taeda* L. e *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Floresta**, Curitiba, v. 35, n. 3, p. 443-449, 2005.

PEREIRA, J. C. D. *et al.* Comparação da qualidade da madeira de três procedências de *Eucalyptus dunnii* Maiden, para fins energéticos. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 13, p. 9-16, 1986.

PIJUT, P. M. *et al.* Technological advances in temperate hardwood tree improvement including breeding and molecular marker applications. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 43, n. 4, p. 283-303, 2007.

POTTS, B. M.; BARBOUR, R. C.; HINGSTON, A. B. **Genetic pollution from farm forestry using eucalypt species and hybrids**. Australia: Canprint, Joint Venture Agroforestry Program, Rural Industries Research and Development Corporation, 2001. 119 p.

PRYOR, L. D. **Biology of eucalypts**. London: Camelot Press, Edward Arnold, 1976. 82 p. (The Institute of Biology's, Studies in Biology, 61).

ROCHA, M. P. da; TOMASELLI, I. Efeito do modelo de desdobro na qualidade da madeira serrada de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus dunnii*. **Cerne**, Lavras, v. 8, n. 2, p. 70-83, 2002.

ROCHA, M. P. da; TRUGILHO, P. F. Qualidade de madeira serrada de *Eucalyptus dunnii* em função do método de desdobro e condição de umidade. **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 4, p. 314-321, 2006.

ROSA, L. S. da **Adubação nitrogenada e substratos na miniestaquia de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 89 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SANTOS, A. F. do; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle**. Colombo: Embrapa Florestas - CNPF, 2001. 20 p. (Circular Técnica, 45).

SEIDLICH, B.; DOUGLAS, S.; OCULUS, E. J. **A vegetation management plan for the Sydney Region**. Sydney: Sydney Regional Organizations, ANCA, ALGA, 1997. 117 p.

SEVERO, E. T. D. Qualidade da secagem de madeira serrada de *Eucalyptus dunnii*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 10, n. 1, p. 109-124, 2000.

SILVA, R. L. da *et al.* Determinação do tamanho ótimo da parcela experimental pelos métodos de máxima curvatura modificado, do coeficiente de correlação intraclasse e da análise visual em testes clonais de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 5, p. 669-676, 2003.

SILVA, P. H. M. da; BRITO, J. O.; SILVA JUNIOR, F. G. da Potential of eleven *Eucalyptus* species for the production of essential oils. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 1, p. 85-89, 2006.

SILVEIRA, R. L. V. de A. *et al.* Seja o doutor do seu eucalipto. **Arquivo do Agrônomo**, n. 12, p. 1-32, 2001. (Informações Agronômicas, 93).

SOUZA JUNIOR, L.; WENDLING, I. Propagação vegetativa de *Eucalyptus dunnii* via miniestaquia de material juvenil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 46, p. 21-30, 2003.

SOUZA JUNIOR, L. **Tipo de minijardim clonal e efeito do ácido indolbutírico na miniestaquia de *Grevillea robusta* A. Cunn. (Proteaceae)**. 66 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SOUZA, L. A. B. de; SILVA FILHO, G. N.; OLIVEIRA, V. L. de Eficiência de fungos ectomicorrízicos na absorção de fósforo e na promoção do crescimento de eucalipto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 4, p. 349-355, 2004.

SWAIN, T. L.; GARDNER, R. A. W. Cold tolerant eucalypts in South Africa: growth information for site-species matching in SA. **Southern African Forestry Journal**, n. 202, p. 83-84, 2004.

SWAMY, S. L.; PURI, S.; SINGH, A. K. Effect of auxins (IBA and NAA) and season on rooting of juvenile and mature hardwood cuttings of *Robinia pseudoacacia* and *Grewia optiva*. **New Forests**, v. 23, n. 2, p. 143-157, 2002.

THINLEY, C. *et al.* Spiral and interlocking grain in *Eucalyptus dunnii*. **Holz als Roh - und Werkstoff**, v. 63, n. 5, p. 372-379, 2005.

TITON, M. *et al.* Efeito do AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2003.

TOZER, M. The native vegetation of the Cumberland Plain, western Sydney: systematic classification and field identification of communities. **Cunninghamia**, v. 8, n. 1, p. 1-75, 2003.

TRUGILHO, P. F. *et al.* Efeitos da idade e classe diamétrica na deformação residual longitudinal em árvores de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 5, p. 725-731, 2004.

TURNER, J.; GESSEL, S. P.; LAMBERT, M. J. Sustainable management of native and exotic plantations in Australia. **New Forests**, v. 18, n. 1, p. 17-32, 1999.

VILLEGAS, M. S.; RIVERA, S. M. Revisión xilológica de las principales especies del género *Eucalyptus* L' Herit. cultivadas en Argentina. **Revista de La Facultad de Agronomía**, La Plata, v. 105, n. 1, p. 9-28, 2002.

WATT, M. P. *et al.* *In vitro* field collection techniques for *Eucalyptus* micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, n. 3, p. 233-240, 2003.

WENDLING, I. **Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia**. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

WENDLING, I. *et al.* Efeito do regulador de crescimento AIB na propagação de clones de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 24, n. 2, p. 187-192, 2000.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p. 187-194, 2001.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Miniestaquia seriada no rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 4, p. 475-480, 2003.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência da miniestaquia seriada no vigor radicular de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 5, p. 681-689, 2005a.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência do ácido indolbutírico e da miniestaquia seriada no enraizamento e vigor de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 29, n. 6, p. 921-930, 2005b.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 20, n. 1, p. 9-16, 1996.

ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; RODRIGUES, J. D. **Estaquia**: uma abordagem dos principais aspectos fisiológicos. Curitiba: UFPR, 2001a. 39 p.

ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; RODRIGUES, J. D. Relações entre época do ano e diferentes concentrações de ácido indol butírico no enraizamento de estacas de *Eucalyptus grandis*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 42, p. 71-80, 2001b.

## CAPÍTULO I

### MINIESTAQUIA DE *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden

#### RESUMO

O trabalho teve como objetivo avaliar a técnica de miniestaquia na clonagem de *E. benthamii* x *E. dunnii* ao longo das estações do ano quanto a: (i) sobrevivência de minicepas e a produção de miniestacas; (ii) sobrevivência e enraizamento de miniestacas e, (iii) determinação da melhor concentração de ácido indolbutírico (AIB) para a promoção dos processos rizogênicos. As minicepas dos clones H12, H19 e H20 foram manejadas durante um ano em minijardim clonal sob sistema semi-hidropônico em leito de areia com solução nutritiva fornecida por gotejamento, efetuando-se 27 coletas sucessivas de brotações durante as quatro estações do ano. Para o estudo do enraizamento, mergulhou-se a porção basal da miniestaca em soluções hidroalcoólicas, cujas concentrações que definiram os tratamentos foram: 0, 2.000, 4.000, 6.000 e 8.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. As minicepas apresentaram alto percentual de sobrevivência após 27 coletas sucessivas de brotações, indicando alta longevidade como fontes fornecedoras de propágulos. A produção e o enraizamento das miniestacas variaram conforme o clone e mostraram-se muito sensíveis as estações do ano e as oscilações da temperatura. A maior produção ocorreu nas estações consideradas mais quentes (primavera e verão) com variação de 635,42 a 852,64 miniestacas m<sup>-2</sup>, e a menor nas estações mais frias (outono e inverno) com 592,38 a 629,36 miniestacas m<sup>-2</sup>. Contudo, os melhores índices de enraizamento foram registrados nas estações mais frias onde variou de 19,59% a 56,20% e os menores nas estações mais quentes, com 4,62% a 8,50%. A produção anual de miniestacas foi de 18.934,76; 20.942,27 e 20.748,14 miniestacas m<sup>-2</sup> ano<sup>-1</sup>, respectivamente para os clones H12, H19 e H20. Quanto ao uso do fitorregulador de crescimento, o AIB influenciou positivamente os processos rizogênicos das miniestacas, sendo constatada resposta diferenciada entre os clones, com variação de 30,32% a 55,45% de enraizamento. Para os clones H12 e H19 os incrementos positivos ocorreram até a maior concentração de AIB. Contudo, o clone H20 apresentou comportamento quadrático com máxima eficiência técnica na concentração de 5.633,8 mg L<sup>-1</sup> de AIB.

**Palavras-chave:** Clonagem. Sazonalidade. Produção de brotos. Enraizamento. AIB.

***Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden  
MINICUTTING**

**ABSTRACT**

This study aimed to evaluate, throughout the seasons, the minicutting technique as cloning method for *E. benthamii* x *E. dunnii* hybrids regarding: (i) ministumps survival and minicuttings production, (ii) minicuttings survival and rooting, (iii) the determination of the best indolebutyric acid (IBA) concentration for rooting promotion. The ministumps of H12, H19 and H20 clones were cultivated during one year in a clonal minigarden under semi-hydroponic system in a sand bed, where the nutritive solution was supplied by dripp irrigation. During the experiment, 27 successive minicuttings samplings were performed in four seasons of the year: spring, summer, autumn and winter. For the rooting study, the minicutting basal portion was immersed in hydro-alcoholic solutions containing IBA concentrations: 0 (control), 2000, 4000, 6000 and 8000 mg L<sup>-1</sup>. All experiments were conducted under whole a randomized design. After 27 successive minicuttings samplings, the ministumps presented high survival percentage, which indicated their high longevity as sprouts supply sources. The minicuttings production and rooting varied in function of the clone and presented high sensitivity of seasons and temperature variations. The highest minicutting production occurred in warmer seasons (spring and summer), with 635.42 until 852.64 minicuttings m<sup>-2</sup> variation, and the lowest in the cooler seasons (autumn and winter), with 592.38 until 629.36 minicuttings m<sup>-2</sup> variation. However, the best rooting indexes occurred in cooler seasons (19.59% until 56.20%) and the lowest in warmer seasons (4.62% until 8.50%). The minicuttings annual production was 18934.76; 20942.27 and 20748.14 minicuttings m<sup>-2</sup> year<sup>-1</sup> for H12, H19 and H20 clones, respectively. In relation to the growth regulator application, the IBA concentrations influenced positively the minicuttings rooting, and it was observed differentiated response among clones, with 30.32% until 55.45% of rooting variation. For the H12 and H19 clones, positive increments on the minicuttings rooting occurred until the highest IBA concentration. However, the H20 clone presented quadratic behavior with maximum response in the 5633.8 mg L<sup>-1</sup> IBA concentration.

**Key words:** Cloning. Seasonality. Sprouts production. Rooting. IBA.

## 1 INTRODUÇÃO

A miniestaquia pode ser considerada uma variação da estaquia convencional (macroestaquia). Basicamente consiste na utilização de brotações de plantas propagadas pelo processo de macroestaquia, ou mudas produzidas por sementes (WENDLING; FERRARI; GROSSI, 2002; ALFENAS *et al.*, 2004).

O surgimento dessa técnica de propagação vegetativa advém das limitações da microestaquia em função da obtenção de material rejuvenescido em laboratório de micropropagação, tanto no que se refere aos aspectos técnicos, estruturais e operacionais, quanto aos de custo (XAVIER; WENDLING, 1998). Atualmente, a miniestaquia constitui-se o método mais adotado pelas empresas florestais brasileiras para a clonagem de *Eucalyptus* (ALMEIDA *et al.*, 2007).

A sua execução consiste na quebra da dominância apical através da poda da macroestaca enraizada, a qual emite novas brotações (miniestacas) para o enraizamento e formação de futuras mudas em intervalos variáveis em função da época do ano, condições estruturais, clone/espécie e condições nutricionais (XAVIER; WENDLING, 1998). Na miniestaquia os propágulos vegetativos, geralmente, variam de 4 cm a 8 cm de comprimento, contendo um par de folhas (miniestacas de base) ou dois pares de folhas (miniestacas de ponta ou de ápice) por miniestaca, com a redução de aproximadamente um terço da área foliar (ALFENAS *et al.*, 2004).

De modo a garantir maior eficiência e padronização da produção de miniestacas por minicepa ao longo do ano, recomenda-se a execução da coleta de brotações de maneira seletiva e contínua, garantindo a minicepa bom estado vegetativo e sistema radicular ativo (TITON *et al.*, 2003b; ALFENAS *et al.*, 2004).

Quanto ao substrato, a composição do mesmo deve favorecer as propriedades físicas e químicas necessárias ao bom processo de enraizamento. Ajustes das condições de umidade e temperatura do ambiente de enraizamento e/ou a mistura de componentes que resultem em maior drenagem podem proporcionar melhores resultados (BRONDANI *et al.*, 2007).

Um dos substratos mais utilizado na miniestaquia de *Eucalyptus* consiste da mistura de casca de arroz carbonizada e vermiculita (1:1 v/v), previamente enriquecida com fertilizante. Em alguns casos, adicionam-se também casca de coco



desfibrada ou turfa como um dos componentes, a fim de aumentar a retenção de água e a capacidade de troca catiônica (ALFENAS *et al.*, 2004).

Como principais avanços, essa técnica promoveu a redução das dimensões do jardim clonal, o qual passou a ser chamado de minijardim clonal. Ele pode ser implantado em sistema de recipientes, que variam desde vasos de polipropileno de diferentes volumes, caixas de fibra de vidro com variadas formas e dimensões, ou em sistemas de “canaletões” de fibro-cimento, atualmente o mais utilizado pelas grandes empresas florestais (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2002).

Esse fato proporcionou maior controle ambiental, fitopatológico, hídrico e nutricional das minicepas, resultando em aumento da produtividade por unidade de área, aumento da taxa de enraizamento, maior uniformidade das miniestacas, menor variação sazonal, facilidade de colheita, menor custo de transporte e processamento de brotações e, a redução ou, em alguns casos, até ausência da aplicação de fitorreguladores de crescimento (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000; WENDLING; XAVIER, 2003; ALFENAS *et al.*, 2004; MAFIA *et al.*, 2005).

Efeitos inerentes às condições ambientais, como a temperatura, fotoperíodo e luminosidade, condicionados pela sazonalidade em cada região (ELDRIDGE *et al.*, 1994; ZUFFELLATO-RIBAS; RODRIGUES, 2001a; HARTMANN *et al.*, 2002; TORRES, 2003), a constituição genética do material a ser propagado (TITON; XAVIER; OTONI, 2002; TITON *et al.*, 2003b; WENDLING; XAVIER; PAIVA, 2003; FERREIRA *et al.*, 2004), assim como fatores relacionados a idade ontogenética (WENDLING; XAVIER, 2001), influenciam significativamente a variação da produção de miniestacas, bem como o enraizamento das mesmas nos diferentes sistemas de minijardins clonais.

Inúmeros trabalhos relacionados a propagação vegetativa de *Eucalyptus* via técnica de miniestaquia têm sido realizados com *Eucalyptus dunnii* (SOUZA JUNIOR; WENDLING, 2003; ROSA, 2006), *Eucalyptus benthamii* (CUNHA; WENDLING; SOUZA JUNIOR, 2005), *Eucalyptus grandis* (TITON; XAVIER; OTONI, 2002; WENDLING, 2002; TITON *et al.*, 2003a; SANTOS *et al.*, 2005; WENDLING; XAVIER, 2005a), *Eucalyptus cloeziana* (ALMEIDA *et al.*, 2007) e *Eucalyptus* spp. (WENDLING *et al.*, 2000; WENDLING; XAVIER, 2003; FERREIRA *et al.*, 2004; CUNHA, 2006).

Dentre esses trabalhos, aplicações de fitorreguladores proporcionaram efeitos positivos aos processos de enraizamento em propágulos vegetativos, sendo o ácido

indolbutírico (AIB) o mais utilizado, variando em suas formas de aplicação, como veiculado em talco e líquido, sendo o último, o mais empregado. O equilíbrio endógeno entre os fitorreguladores tem forte influência na emissão de raízes adventícias, porém as concentrações exógenas podem variar em função das condições de trabalho e das características de cada material.

Como é um híbrido novo, não existem estudos sobre a propagação vegetativa de *E. benthamii* x *E. dunnii* via técnica de miniestaquia. Devido a esse fato, o trabalho teve como objetivos: (i) avaliar a sobrevivência de minicepas e a produção de miniestacas; (ii) avaliar a sobrevivência e enraizamento de miniestacas e, (iii) determinar a melhor concentração de ácido indolbutírico (AIB) para o enraizamento de miniestacas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 CARACTERIZAÇÃO GERAL DO EXPERIMENTO

O trabalho foi conduzido de outubro de 2006 a setembro de 2007 no Laboratório de Propagação de Plantas da Embrapa Florestas - CNPF, situada em Colombo - PR (25°20' S e 49°14' W, 950 m). Segundo classificação de Köppen, o clima da região é temperado, do tipo Cfb, ou seja, temperatura do mês mais frio entre -3 °C a 18 °C, sempre úmido, chuva em todos os meses do ano e temperatura do mês mais quente inferior a 22 °C, mas no mínimo 4 meses com temperatura maior que 10 °C.

### 2.2 OBTENÇÃO DOS CLONES E CONSTITUIÇÃO DO MINIJARDIM CLONAL

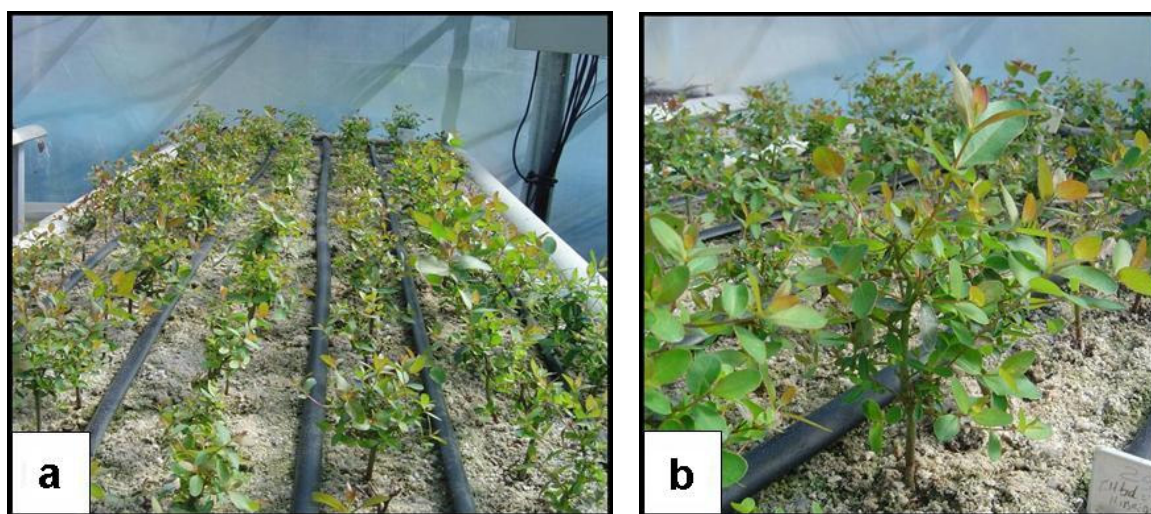
Utilizaram-se genótipos superiores do híbrido natural de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* de aproximadamente um ano de idade, identificados como H12, H19 e H20, os quais foram selecionados precocemente pela equipe de melhoramento florestal da Embrapa Florestas. As matrizes, de onde se originaram esses clones, foram plantadas no município de Guarapuava - PR no espaçamento inicial de 3 m x 2 m (SANTOS; DUTRA; SILVA *et al.*, 2007, não publicado)<sup>2</sup>.

A partir das brotações produzidas pelas matrizes decepadas foram obtidas estacas dos ramos da parte aérea, as quais foram enraizadas em casa de vegetação. Como recipientes de cultivo foram utilizados tubetes plásticos de forma cônica de 55 cm<sup>3</sup>, contendo como substrato a mistura de casca de arroz carbonizada, vermiculita média e substrato comercial a base de casca de pinus e vermiculita (1:1:1 v/v). Em Janeiro de 2006, mudas dos clones com 90 dias de idade e aproximadamente 15 cm de altura foram transferidas para sistema semi-hidropônico de canaletão em leito de areia e, plantadas no espaçamento 10 cm x 15 cm.

---

<sup>2</sup> SANTOS, P. E. T. dos; DUTRA, L. F.; SILVA, H. D. da **Desempenho silvicultural e propagação vegetativa de genótipos superiores selecionados precocemente do híbrido espontâneo *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii***. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. 7 p. (Relatório à Embrapa Florestas - CNPF). Não Publicado.

Decorridos 21 dias para adaptação das mudas ao sistema semi-hidropônico, procedeu-se a poda da brotação apical para formar as minicepas, a partir do desenvolvimento das brotações basais induzidas pela quebra da dominância apical. A poda foi efetuada 7 cm acima do caule da brotação de cada estaca enraizada, tomando-se o cuidado de manter, no mínimo, um par de folhas remanescentes por minicepa, a fim de reduzir o estresse e facilitar a iniciação da brotação posterior, conforme metodologia descrita por Wendling (1999), constituindo desta forma o minijardim clonal (Figura 1a).



**FIGURA 1** - (a): detalhe do minijardim clonal de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni* e, (b): brotações aptas para a coleta. Foto: Brondani (2006).

### 2.3 MANEJO E NUTRIÇÃO DAS MINICEPAS

O minijardim clonal foi mantido em condições de estufa recoberta com polietileno, onde as minicepas foram submetidas a sucessivas coletas de brotações produzidas durante todo o período experimental. Procedeu-se limpeza semanal do sistema, com eliminação de folhas, brotações e minicepas mortas. Os dados de temperatura do ar registrados na estufa durante todo o período experimental encontram-se no Anexo 1.

Nas datas de 29/01/2007 e 16/07/2007 (13º e 24º coletas) efetuou-se aplicação de fungicida Kumulus DF® a 3 g L<sup>-1</sup> (p/v) (Enxofre como i.a.<sup>3</sup> modo de ação: contato), 13/08/2007 (25º coleta) Opera® a 1,5 g L<sup>-1</sup> (v/v) (Epoxyconazole +

<sup>3</sup> Ingrediente ativo.

Pyraclostrobin como i.a. modo de ação: sistêmico) e 05/09/2007 (26<sup>o</sup> coleta) Bayfidan CE<sup>®</sup> a 2 ml L<sup>-1</sup> (v/v) (Triadimenol como i.a. modo de ação: sistêmico), respectivamente, conforme recomendações de Alfenas *et al.* (2004).

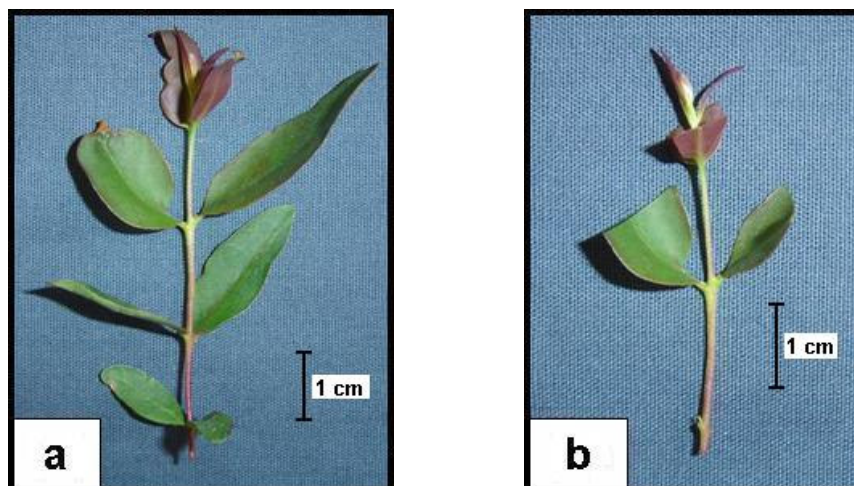
As minicepas receberam solução nutritiva por gotejamento, a qual foi distribuída 3 vezes ao dia a uma vazão total diária de 5 L m<sup>-2</sup>. A solução nutritiva foi composta por monoamônio fosfato (0,04 g L<sup>-1</sup>), sulfato de magnésio (0,40 g L<sup>-1</sup>), nitrato de potássio (0,44 g L<sup>-1</sup>), sulfato de amônio (0,31 g L<sup>-1</sup>), cloreto de cálcio (0,79 g L<sup>-1</sup>), ácido bórico (2,88 mg L<sup>-1</sup>), sulfato de manganês (3,70 mg L<sup>-1</sup>), molibdato de sódio (0,18 mg L<sup>-1</sup>), sulfato de zinco (0,74 mg L<sup>-1</sup>) e hidroferro em pó (81,80 mg L<sup>-1</sup>). Durante a renovação da solução nutritiva, realizada a cada três semanas, a condutividade elétrica foi mantida em 1,6 mS m<sup>-2</sup> a 25 °C e o pH ajustado a 5,5 (± 0,1), corrigido com ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH), ambos a 1M.

## 2.4 COLETA DE BROTAÇÕES E PREPARO DAS MINIESTACAS

As brotações de três clones (H12, H19 e H20) de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* foram coletadas, preferencialmente, no período matinal, a fim de reduzir a evapotranspiração das miniestacas. Para tal, utilizaram-se tesouras de poda, previamente esterilizadas em álcool (70% v/v). Durante todo o processo, as brotações foram armazenadas em caixas de isopor contendo água, a fim de minimizar a perda da turgescência celular dos tecidos vegetais.

As coletas foram efetuadas em diferentes intervalos de tempo e de maneira seletiva, ou seja, brotações menores que 5 cm e com menos de 3 pares de folhas foram mantidas na minicepa para as coletas subseqüentes (Figura 1b). Em função da época do ano, o intervalo entre cada coleta variou de 8 a 21 dias, tomando-se o cuidado de manter a padronização estabelecida quanto à seleção das brotações.

Logo após a coleta das brotações (Figura 2a) foram preparadas as miniestacas, sem a remoção da ponteira (gema apical). Na região basal, foi efetuado um corte reto, mantendo um par de gemas. As miniestacas apresentaram comprimento de 5 cm (± 1 cm) contendo um par de folhas, reduzidas a 50% da sua área (Figura 2b).



**FIGURA 2** - (a): brotação logo após a coleta da minicepa de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, contendo a ponteira e 3 pares de folhas, (b): detalhe da miniestaca após o preparo e padronização. Foto: Brondani (2006).

## 2.5 SOBREVIVÊNCIA DE MINICEPAS E PRODUÇÃO DE MINIESTACAS

A sobrevivência das minicepas e a produção de miniestacas do minijardim clonal de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, foram avaliadas durante um período de 12 meses (outubro a dezembro de 2006 e janeiro a setembro de 2007) efetuando-se 27 coletas sucessivas, contemplando as 4 estações do ano (primavera, verão, outono e inverno). O experimento foi instalado aos 215 dias, aproximadamente 7 meses após o plantio das mudas no sistema semi-hidropônico, o que correspondeu ao mês de outubro de 2006.

Além da análise dos dados em função das diferentes coletas, também foi possível avaliar os efeitos das estações do ano sobre as coletas. Para tanto, utilizaram-se os valores médios dentro de cada estação para comparar a variação da produção dos clones (H12, H19 e H20) ao longo da primavera (22 de setembro a 21 de dezembro), verão (22 de dezembro a 21 de março), outono (22 de março a 21 de junho) e inverno (22 de junho a 21 de setembro).

Como variáveis respostas, foram mensuradas as características relativas a sobrevivência de minicepas (SM), a produção de miniestacas por minicepa (PMM), produção de miniestacas por metro quadrado (PMQ) e a produção de miniestacas por metro quadrado ao ano (PMQA).

O experimento referente a sobrevivência de minicepas e produção de miniestacas em função das coletas foi conduzido no delineamento inteiramente

casualizado em arranjo fatorial (3x27), sendo os fatores constituídos por 3 clones (H12, H19 e H20) e 27 coletas sucessivas de brotações ao longo de 352 dias. Para tanto, utilizaram-se 5 repetições, contendo 4 minicepas por repetição.

O experimento referente a produção de miniestacas em função das estações do ano foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3x4), sendo os fatores constituídos por 3 clones (H12, H19 e H20) e 4 estações do ano (primavera, verão, outono e inverno). Para tanto, utilizaram-se 5 repetições, contendo 4 minicepas por repetição.

## 2.6 SOBREVIVÊNCIA E ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS

A cada coleta de brotações efetuada no minijardim clonal foram instalados experimentos para avaliar a sobrevivência e o enraizamento das miniestacas ao longo dos 352 dias. Os fatores considerados foram os mesmos do item 2.5.1.

A região basal das miniestacas foi mergulhada durante 10 segundos em solução hidroalcoólica contendo 2.000 mg L<sup>-1</sup> do fitorregulador AIB (diluído a 50% em álcool e 50% em água v/v). Logo após foram estaqueadas em tubetes plásticos cônicos (55 cm<sup>3</sup>), com a inserção de aproximadamente 2 cm da região basal da miniestaca no substrato de cultivo, o qual foi composto pela mistura de casca de arroz carbonizada e vermiculita média (1:1 v/v).

Ao longo do experimento avaliaram-se a sobrevivência das miniestacas na saída da casa de vegetação (SSCV), saída da casa de sombra (SSCS) e sobrevivência em área de pleno sol (SAPS). Durante a SSCV e SSCS consideraram-se vivas, apenas, as miniestacas que mantiveram o vigor, caracterizado principalmente pela manutenção da coloração verde. Na SAPS consideraram-se somente as miniestacas enraizadas, a qual foi caracterizada pela emissão da raiz na porção inferior do tubete.

O experimento referente ao enraizamento de miniestacas em função das coletas foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3x27), sendo os fatores constituídos por 3 clones (H12, H19 e H20) e 27 coletas ao longo de 352 dias. Para tanto, utilizaram-se 5 repetições, contendo 20 miniestacas por repetição.

O experimento referente ao enraizamento de miniestacas em função das estações do ano foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3x4), sendo os fatores constituídos por 3 clones (H12, H19 e H20) e 4 estações do ano (primavera, verão, outono e inverno). Para tanto, utilizaram-se 5 repetições, contendo 20 miniestacas por repetição.

## 2.7 MANEJO E FERTILIZAÇÃO DAS MINIESTACAS

Previamente a adição do substrato ao recipiente de cultivo, os tubetes foram expostos a uma solução a 0,25% (v/v) de cloro ativo (NaOCl) por 48 horas, visando erradicar possíveis fontes de patógenos e, em seguida, foram enxaguados com água corrente, a fim de remover os resíduos.

O substrato foi composto pela mistura de casca de arroz carbonizada e vermiculita média (1:1 v/v), sendo incorporado 4 kg m<sup>-3</sup> de superfosfato simples (20% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 14% de S) e 1,5 kg m<sup>-3</sup> de FTEBR12 (9% Zn, 3% Fe, 2% Mn, 0,1% Mo, 1,8% B, 0,8% Cu).

Para a promoção dos processos rizogênicos, as miniestacas permaneceram em casa de vegetação automatizada em períodos variáveis de 25 a 35 dias, em função da época do ano. A umidade relativa do ar (UR ≥ 80%) e a temperatura do ar (T < 30 °C) foram mantidas sob controle automático, através de umidostato e termostato, respectivamente. Os valores médios semanais da temperatura do ar registrados na casa de vegetação automatizada em cada época do ano encontram-se no Anexo 2.

Decorrido o tempo de enraizamento, as miniestacas foram transferidas para casa de vegetação com sombrite de 50% para aclimação durante 14 a 21 dias, variável em função da época do ano. O sistema de microaspersão funcionou com pressão de água da rede e foi controlado por timer em intervalos pré-estabelecidos. O sistema foi composto por 12 microaspersores (amarelos) de 2,0 kg cm<sup>-2</sup> de pressão, com vazão de 144 L hora<sup>-1</sup> (2,4 L minuto<sup>-1</sup>), o qual ligou durante 2 minutos a cada 2 horas.

Após o processo de aclimação, as miniestacas foram transferidas para uma área de pleno sol, visando a rustificação e crescimento durante 28 dias. O sistema de aspersão funcionou com pressão de água de rede (2,0 kg cm<sup>-2</sup>) e foi



controlado por timer em intervalos pré-estabelecidos. O sistema foi composto por 12 microaspersores (verdes) de 97 L hora<sup>-1</sup>, o qual ligou 3 vezes ao dia, sendo 30 minutos por vez nos períodos mais quentes e 20 minutos nos períodos mais frios.

Da fase de aclimação até a rustificação, realizou-se adubação semanal de cobertura com 6 ml muda<sup>-1</sup>, utilizando-se a seguinte formulação: sulfato de amônio (4 g L<sup>-1</sup>), superfosfato triplo (10 g L<sup>-1</sup>), cloreto de potássio (4 g L<sup>-1</sup>), e solução de micronutrientes (10 ml L<sup>-1</sup>), composta por: 9% de Zn; 1,8% de B; 0,8% de Cu; 3% de Fe; 2% de Mn e 0,12% de Mo.

## 2.8 EFEITO DO ÁCIDO INDOLBUTÍRICO NO ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS

Com a finalidade de verificar a concentração mais eficiente de fitorregulador na promoção do processo rizogênico dos clones H12, H19 e H20, foram instalados, mensalmente, experimentos com diferentes concentrações de AIB.

Para tanto, mergulhou-se a porção basal das miniestacas durante 10 segundos em diferentes soluções hidroalcoólicas nas seguintes concentrações: 0, 2.000, 4.000, 6.000 e 8.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB (diluído a 50% em álcool e 50% em água v/v). Logo após foram estaqueadas em tubetes plásticos cônicos (55 cm<sup>3</sup>), com a inserção de aproximadamente 2 cm da região basal da miniestaca no substrato de cultivo.

Ao longo do experimento avaliaram-se a sobrevivência das miniestacas na saída da casa de vegetação (SSCV), na saída da casa de sombra (SSCS) e a sobrevivência em área de pleno sol (SAPS). Na avaliação da SSCV (aos 35 dias) e SSCS (aos 56 dias) consideraram-se vivas, apenas as miniestacas que mantiveram o vigor, caracterizado pela coloração verde. Na SAPS (aos 86 dias) consideraram-se somente as miniestacas enraizadas, as quais foram caracterizadas pela emissão da raiz na porção inferior do tubete. Destas, foram avaliadas as características do número de folhas e o comprimento médio de brotações.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3x5), sendo os fatores constituídos por 3 clones (H12, H19 e H20) e 5 concentrações de AIB (0, 2.000, 4.000, 6.000 e 8.000 mg L<sup>-1</sup>), com 5 repetições, contendo 10 miniestacas por repetição.

## 2.9 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste de Bartlett ( $p < 0,05$ ), a fim de verificar a homogeneidade da variância entre os tratamentos e, em seguida, procedeu-se a análise de variância (ANOVA) ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ) e a correlação de Pearson entre as características amostradas ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ).

Os dados qualitativos foram comparados pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) e Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) e, os quantitativos foram submetidos a análise de regressão polinomial ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ).

Utilizaram-se os pacotes estatísticos MSTAT (STATISTICAL PROGRAM, 1994) e SOC (EMBRAPA, 1990) para a realização dos procedimentos estatísticos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 SOBREVIVÊNCIA DE MINICEPAS E PRODUÇÃO DE MINIESTACAS

Houve interação ( $p < 0,01$ ) entre os fatores testados quanto a produção de miniestaca por minicepa (PMM) e a produção de miniestaca por metro quadrado (PMQ). No entanto, a sobrevivência das minicepas (SM) apenas variou significativamente ( $p < 0,01$ ) quanto ao fator clone, não existindo efeito das coletas (Tabela 1).

**TABELA 1** - Resumo da análise de variância para as características da sobrevivência das minicepas (SM), produção de miniestaca por minicepa (PMM) e produção de miniestaca por metro quadrado (PMQ) de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*.

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios		
		SM (%)	PMM (minies. minic. <sup>-1</sup> )	PMQ (minies. m <sup>-2</sup> )
Clone (CL)	2	16.918,20**	32,51**	145.849,70**
Coleta (COL)	26	121,55 <sup>ns</sup>	82,67**	367.876,23**
CL x COL	52	43,20 <sup>ns</sup>	11,94**	52.975,74**
Resíduo	324	243,05	2,06	9.216,03
Média	-	89,68	10,33	688,23
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	17,30	13,93	13,95

<sup>ns</sup> não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

GL = graus de liberdade, CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental, minies. = miniestaca, minic. = minicepa.

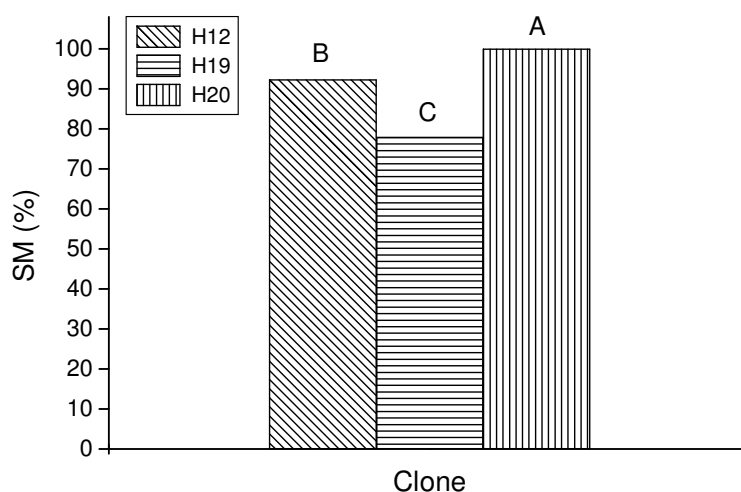
Segundo Storck *et al.* (2000) a importância do coeficiente de variação experimental (CV<sub>exp.</sub>) deve-se ao fato de estimar a magnitude do erro experimental e, como é um coeficiente sem unidade de medida, pode ser utilizado para comparar a precisão de experimentos. No entanto, a precisão de um experimento apenas pode ser considerada como alta, média ou baixa somente em relação a um grupo de experimentos semelhantes.

Na literatura não existem trabalhos que classifiquem os valores do CV<sub>exp.</sub> em relação as variáveis mais utilizadas na miniestaquia para o gênero *Eucalyptus*. Portanto, a fim de buscar alguma precisão experimental, optou-se por comparar os resultados do CV<sub>exp.</sub> com trabalhos que tratem do mesmo assunto.

### 3.1.1 Sobrevivência de minicepas

Segundo Hartmann *et al.* (2002) cada material genético pode responder de maneira diferenciada a propagação vegetativa. Esse fato foi confirmado no presente estudo, onde os 3 clones estudados apresentaram comportamento diferenciado quanto a sobrevivência de minicepas (SM) ao longo das 27 coletas efetuadas.

O melhor desempenho quanto a SM ocorreu para o clone H20, que apresentou 100% de sobrevivência de minicepas durante os 352 dias de coletas sucessivas de miniestacas, diferindo significativamente dos demais. O clone H12 apresentou valor médio de 91,82% de SM, desempenhando comportamento intermediário para essa característica. A maior mortalidade observada de minicepas foi verificada para o clone H19, o qual apresentou 77,22% de SM, o que leva a supor, maior sensibilidade desse clone quanto aos efeitos do manejo e condições ambientais no minijardim clonal (Figura 3). A mortalidade de minicepas do clone H19 começou a ser registrada a partir da 6ª coleta de brotações, sendo que para o clone H12 iniciou a partir da 7ª coleta.



**FIGURA 3** - Valores médios da sobrevivência de minicepas (SM) dos clones H12, H19 e H20 de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni*, ao longo de 352 dias de coletas sucessivas de miniestacas. Médias diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

De maneira geral, para o gênero *Eucalyptus*, é comum a ocorrência de elevada sobrevivência de minicepas de diferentes materiais genéticos, quando conduzidas em vários tipos de minijardins clonais e submetidas a coletas sucessivas de brotações.

Estudos realizados por Wendling (1999) indicaram alta sobrevivência de minicepas de *Eucalyptus* spp. para todos os clones estudados, com valores médios superiores a 95% após 5 coletas de miniestacas. Titon *et al.* (2003b) também relataram sobrevivência de minicepas superior a 98% para *E. grandis*, após 8 coletas. Em outro estudo, Wendling, Xavier e Paiva (2003) observaram sobrevivência de minicepas de *E. grandis* superior a 96% após 7 coletas de miniestacas, independente do clone e sub-cultivo estudados.

Na mesma linha de pesquisa, Souza Junior e Wendling (2003) ao trabalhar com *E. dunnii* observaram 100% de sobrevivência de minicepas após a efetuação de 4 coletas de miniestacas. Resultados similares foram encontrados por Rosa (2006), que relatou sobrevivência de minicepas em torno de 100%, após 14 coletas de brotações de *E. dunnii*. Cunha, Wendling e Souza Junior (2005) relataram 88% de sobrevivência de minicepas de *E. benthamii*, após 5 coletas de miniestacas.

Os valores médios de sobrevivência apresentados pelos clones H20 e H12 corroboram com os existentes na literatura, embora aqueles reportam um número bastante inferior de coletas de miniestacas em comparação com as 27 coletas efetuadas no presente estudo. Dessa forma, mesmo que o clone H19 tenha apresentado a menor sobrevivência em relação aos demais, isto não inviabiliza a sua condução para a produção de brotações, pois os clones não apresentaram mortalidade elevada de minicepas durante os 352 dias (Figura 3).

Com base nessas observações e, nas condições deste experimento, pode-se inferir que as minicepas apresentam longevidade satisfatória para a produção de miniestacas, o que possibilitou inúmeras coletas sucessivas de brotações sem a ocorrência de mortalidade significativa das mesmas em relação ao fator coleta de brotações (Tabela 1), não sendo necessária a sua substituição em um curto espaço de tempo.

Além disso, a SM não apresentou correlação significativa com a PMM, a PMQ e com a variação das médias das temperaturas máximas ( $T_{\text{máx}}$ ), temperaturas médias ( $T_{\text{méd}}$ ) e temperaturas mínimas ( $T_{\text{mín}}$ ) registradas na estufa de polietileno (Anexo 3), indicando que o manejo do minijardim clonal e as condições ambientais da estufa não influenciaram significativamente quanto ao comportamento da sobrevivência de minicepas.

Em termos gerais, a alta sobrevivência das minicepas observada evidencia que a metodologia adotada ao longo do período experimental, quanto às condições de cultivo no minijardim clonal, foram tecnicamente adequadas.

### 3.1.2 Produção de miniestacas em função das coletas

O valor do  $CV_{exp.}$  obtidos para a PMM e a PMQ estão condizentes aos registrados na literatura para miniestaquia de *Eucalyptus* (WENDLING, 1999; TITON *et al.*, 2003b), o que denota adequada precisão experimental (Tabela 1).

Devido ao elevado número de coletas, o que levou a comparação entre períodos climáticos muito distintos, o teste de comparação de médias por Scott-Knott, aplicado ao experimento como um todo, revelou uma variação muito grande no comportamento dos clones, o que aumentou a complexidade e dificultou a interpretação dos dados. Portanto, embora tenha sido constatada interação entre os fatores testados para as características da PMM e a PMQ (Tabela 1), optou-se por apresentar apenas os valores médios em gráficos de colunas para cada estação do ano, a fim de facilitar a interpretação.

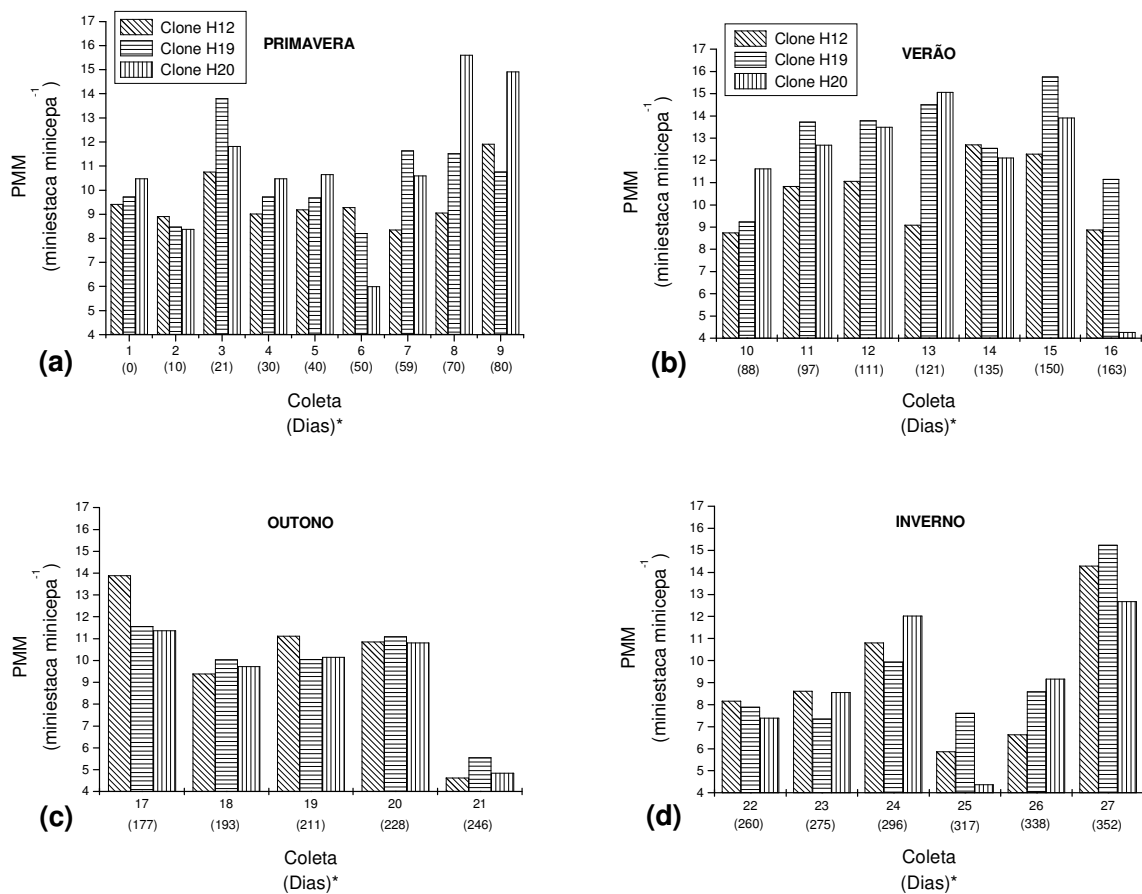
Os menores intervalos entre as coletas de brotações ocorreram durante as estações da primavera, de 9 a 11 dias, e verão, de 8 a 15 dias, proporcionando as maiores quantidades de coleta de propágulos. Na primavera foi possível realizar um total de 9 coletas e no verão um total de 7 coletas, seguindo rigorosamente o padrão de miniestaca previamente estabelecido (Figuras 4 e 5).

Nas estações do outono e inverno, as quais correspondem aos períodos de repouso vegetativo (ZUFFELLATO-RIBAS; RODRIGUES, 2001a), verificou-se queda do número de coletas de brotações, apresentando valores de 5 e 6 coletas, respectivamente. Nesses períodos, os intervalos entre as coletas foram maiores, variando de 14 a 18 dias no outono e, de 14 a 21 dias durante o inverno (Figuras 4 e 5).

Em relação a variação da produção de miniestacas por minicepa (PMM), pode-se verificar que durante a estação da primavera o clone H12 apresentou valores médios de 8,36 a 11,92, o clone H19 apresentou variação de 8,22 a 13,80 e o H20 de 6,00 a 15,62 miniestacas por minicepa (Figura 4a). Durante o verão foi constatado pequeno aumento desses valores, onde o clone H12 variou de 8,76 a

12,72 miniestacas por minicepa, o clone H19 de 9,24 a 15,76 e o clone H20 de 4,28 a 15,08 miniestacas por minicepa (Figura 4b).

Nas estações de outono e inverno ocorreu queda dos valores da PMM por coleta para todos os clones. No outono o clone H12 apresentou variação de 4,64 a 13,90 miniestacas por minicepa, o clone H19 de 5,56 a 11,56 e o H20 de 4,86 a 11,38 miniestacas por minicepa (Figura 4c). No inverno o H12 apresentou 5,88 a 14,30, o H19 de 7,36 a 15,24 e o H20 de 4,38 a 12,70 miniestacas por minicepa (Figura 4d).

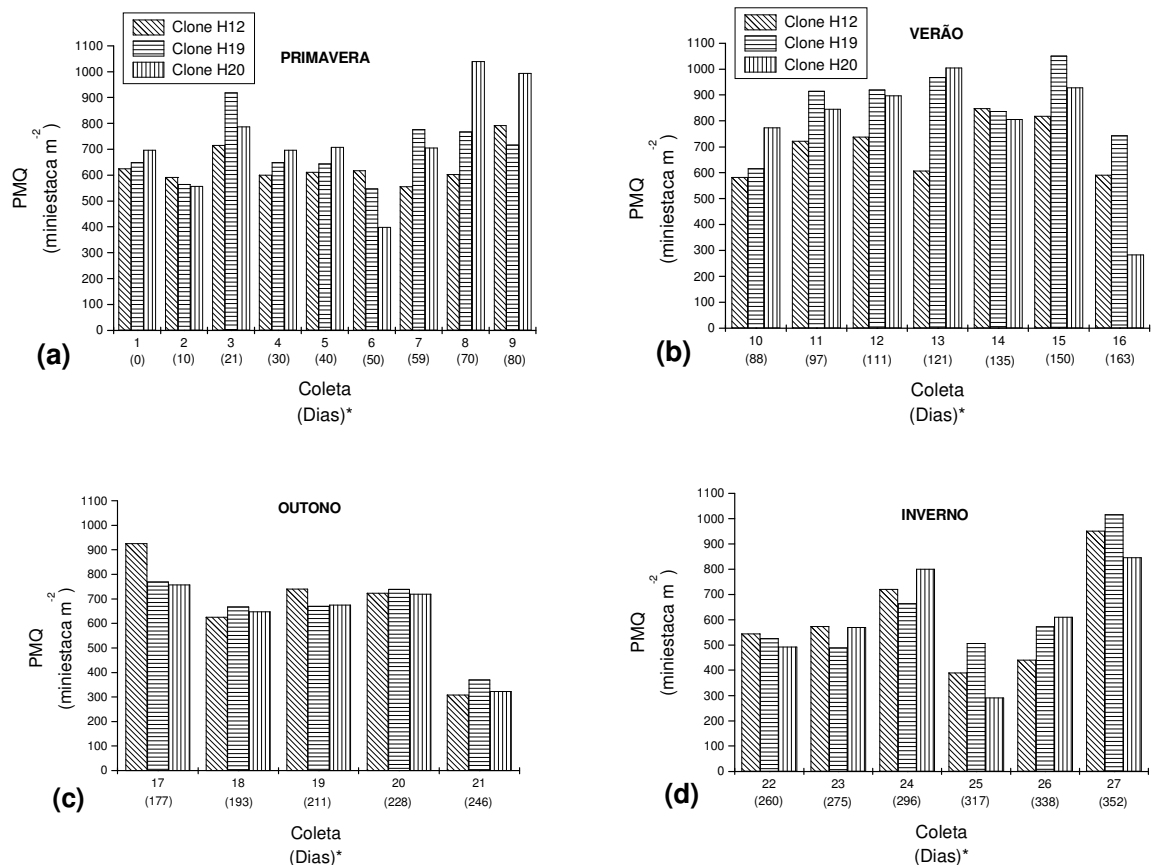


**FIGURA 4** - Variação da produção de miniestacas por minicepa (PMM) de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni*, ao longo de 352 dias de coletas sucessivas de brotações, em sistema semi-hidropônico do tipo canaletão em leito de areia. (a): coleta de miniestacas na estação da primavera, (b): verão, (c): outono e (d): inverno. \* valores entre parênteses referem-se ao intervalo de dias entre as coletas.

Em relação a PMQ (Figura 5), na estação da primavera o clone H12 apresentou variação de 556,00 a 792,98 miniestacas  $m^{-2}$  por coleta. Já a produção para o clone H19 variou de 548,00 a 918,75 miniestacas  $m^{-2}$  e, o clone H20 apresentou produção de 399,58 a 1.040,67 miniestacas  $m^{-2}$  (Figura 5a). No verão o

clone H12 apresentou variação de 583,33 a 848,75 miniestacas  $m^{-2}$ , o clone H19 variou de 616,39 a 1.050,97 miniestacas  $m^{-2}$  e o clone H20 de 283,33 a 1.005,67 miniestacas  $m^{-2}$  (Figura 5b).

No outono foi registrada variação da produção de 309,17 a 926,52 miniestacas  $m^{-2}$  para o clone H12, de 370,42 a 770,36 miniestacas  $m^{-2}$  para o clone H19 e de 323,75 a 759,00 miniestacas  $m^{-2}$  para o clone H20 (Figura 5c). Durante o inverno o clone H12 apresentou variação de 391,03 a 951,61 miniestacas  $m^{-2}$ , o clone H19 apresentou variação da produção de 490,07 a 1.015,55 miniestacas  $m^{-2}$  e o clone H20 variação de 291,67 a 847,08 miniestacas  $m^{-2}$  (Figura 5d).



**FIGURA 5** - Variação da produção de miniestacas por metro quadrado (PMQ) de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni*, ao longo de 352 dias de coletas sucessivas de brotações, em sistema semi-hidropônico do tipo canaletão em leito de areia. (a): coleta de miniestacas na estação da primavera, (b): verão, (c): outono e (d): inverno. \* valores entre parênteses referem-se ao intervalo de dias entre as coletas.

A ANOVA revelou efeito significativo ( $p < 0,01$ ) para a produção de miniestacas por metro quadrado ao ano (PMQA), em função do fator clone (Tabela 2).



**TABELA 2** - Resumo da análise de variância para a característica da produção de miniestaca por metro quadrado ao ano (PMQA) de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*.

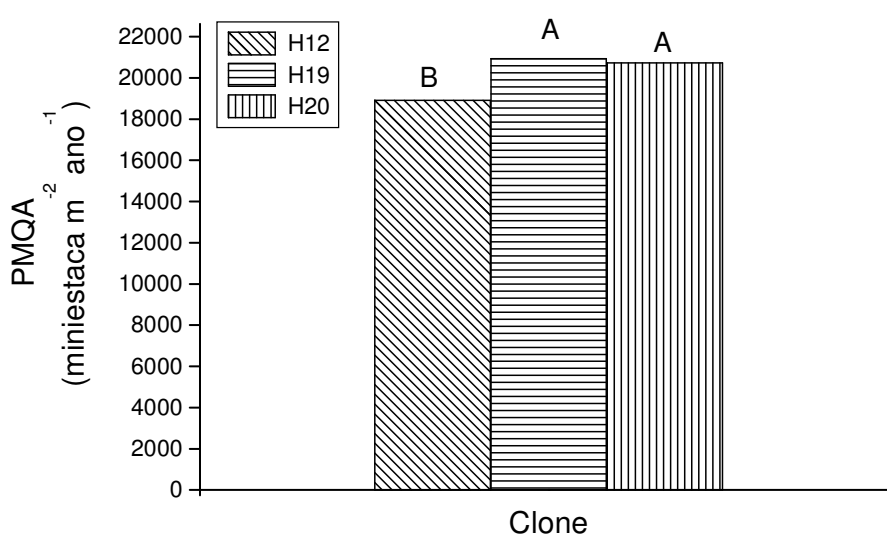
Causas da Variação	GL	Quadrados Médios
		PMQA (minies. m <sup>-2</sup> ano <sup>-1</sup> )
Clone (CL)	2	6.130.100,69**
Resíduo	12	769.052,73
Média	-	20.208,39
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	4,34

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

GL = graus de liberdade, CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental, minies. = miniestaca.

Os clones H19 e H20 não diferiram significativamente quanto a produção de miniestacas por metro quadrado ao ano (PMQA), apresentando valores médios de 20.942,27 miniestacas m<sup>-2</sup> ano<sup>-1</sup> e 20.748,14 miniestacas m<sup>-2</sup> ano<sup>-1</sup>, respectivamente. Porém, diferiram do clone H12, o qual apresentou a menor média para essa característica, com 18.934,76 miniestacas m<sup>-2</sup> ano<sup>-1</sup> (Figura 6).

De maneira geral, os dados apresentados para a característica da PMQA encontram-se dentro dos padrões registrados na literatura para o gênero *Eucalyptus*, quando se utiliza miniestaca apical como propágulo e, oriundos de minicepas manejadas em minijardim clonal. Geralmente, esse tipo de sistema de produção apresenta variação de 7.488 a 41.480 miniestacas m<sup>-2</sup> ano<sup>-1</sup>, dependendo do tipo de minijardim clonal e do material genético (ALFENAS *et al.*, 2004).



**FIGURA 6** - Variação da produção de miniestacas por metro quadrado ao ano (PMQA) de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, ao longo de 352 dias de coletas sucessivas de brotações, em sistema semi-hidropônico do tipo canaletão em leito de areia. Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

A PMM (Figura 4) e a PMQ (Figura 5) apresentaram oscilação ao longo das 27 coletas efetuadas. Tal fato concorda com os resultados registrados na literatura ao empregar a técnica de miniestaquia para *Eucalyptus* (WENDLING, 1999; SOUZA JUNIOR; WENDLING, 2003; TITON *et al.*, 2003b; WENDLING; XAVIER; PAIVA, 2003; CUNHA; WENDLING; SOUZA JUNIOR, 2005; ROSA, 2006), onde o efeito de alta produção de brotações seguido de queda e novamente sucedida por uma alta produtividade é freqüente.

Esses efeitos podem estar relacionados ao vigor fisiológico das minicepas (WENDLING, 1999; HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2002; ROSA, 2006), onde o balanço nutricional da minicepa e a retomada ao crescimento de novas brotações, fatores que variam em função da freqüente coleta de miniestacas, desempenham papel fundamental para desencadear esse tipo de comportamento.

Titon *et al.* (2003b) salientam que o efeito cíclico da produção de brotações deve estar associado, também, aos clones (genótipos) e ao manejo adotado na fertirrigação, cuja nutrição equilibrada permite o desenvolvimento mais vigoroso das brotações. Além disso, fatores ligados a variação da temperatura, juvenilidade das minicepas e a sazonalidade (WENDLING; FERRARI; GROSSI, 2002; WENDLING; XAVIER; PAIVA, 2003; ALFENAS *et al.*, 2004) também podem afetar significativamente a produção de miniestacas, bem como, o intervalo entre as coletas.

Além disso, o aumento da produção de miniestacas registrado na 9ª e 27ª coletas pode estar associado a entrada das estações do verão e da primavera, respectivamente, as quais são sucedidas pelo aumento gradual da temperatura. Já a queda de produção de miniestacas registrada na 16ª e 21ª coletas pode ter ocorrido devido ao início das estações de outono e inverno, respectivamente, onde os valores médios das temperaturas máximas e mínimas foram menores (Anexo 1).

Rosa (2006), embora tenha registrado menores índices de produção, também verificou distribuição desigual das coletas de brotações na miniestaquia de *E. dunnii* nas 4 estações do ano. No entanto, o autor trabalhou com sistema de produção em minijardim clonal do tipo tubete, o que geralmente apresenta menor produção de miniestacas em comparação ao sistema semi-hidropônico, o qual pode apresentar o dobro ou mais de produção (CUNHA; WENDLING; SOUZA JUNIOR, 2005; CUNHA, 2006). Segundo Assis e Mafia (2007), a maior produtividade de

miniestacas em leito de areia, provavelmente, deve estar relacionada com o maior volume de substrato passível de exploração pelo sistema radicial da minicepa, e dessa forma, alcançar maior estabilidade nutricional.

Em termos gerais, as minicepas não apresentaram tendência de exaustão definitiva em função de cada estação, mas sim temporária. Esse fato pode ser evidenciado pelo aumento dos valores da PMM e PMQ ocorridos na 27ª coleta (entrada da primavera), em que os índices de produção chegaram próximos aos valores registrados durante a primavera, independente da característica mensurada.

Segundo Titon *et al.* (2003b) o comportamento cíclico referente a produção de propágulos vegetativos pode estar associado a um princípio de exaustão temporária das minicepas. Devido a essa característica, pode-se supor que, caso fosse dado continuidade ao experimento, os resultados de produção poderiam ser semelhantes aos encontrados nas estações antecedentes e, começariam a diminuir, no instante em que as minicepas expressassem princípios de exaustão mais significativos, como a queda demasiada da produção de miniestacas e a perda do vigor, o que indicaria o momento da substituição por novas minicepas.

Portanto, a queda ou aumento da produção de miniestacas ocorridos dentro do período experimental estariam mais ligados, possivelmente, a fatores ambientais como a variação da temperatura e luminosidade, condicionadas pela sazonalidade, e ao manejo adotado, como o intervalo e a intensidade de poda, visto que, a nutrição fornecida as minicepas e o tipo de poda foram as mesmas ao longo das 4 estações.

### 3.1.3 Produção de miniestacas em função das estações do ano

Houve interação quanto a variação da produção de miniestacas dos clones (H12, H19 e H20) em função das estações do ano (primavera, verão, outono e inverno) para as características da PMM ( $p < 0,05$ ) e PMQ ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3).

**TABELA 3** - Resumo da análise de variância para as características da produção de miniestaca por minicepa (PMM) e da produção de miniestaca por metro quadrado (PMQ) de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*.

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios	
		PMM (minies. minic. <sup>-1</sup> )	PMQ (minies. m <sup>-2</sup> )
Clone (CL)	2	3,34**	15.367,0**
Estação (EST)	3	25,74**	113.403,8**
CL x EST	6	1,22*	5.665,8*
Resíduo	48	0,44	1.937,0
Média	-	10,09	672,71
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	6,64	6,54

\* e \*\* significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente, pelo teste F.

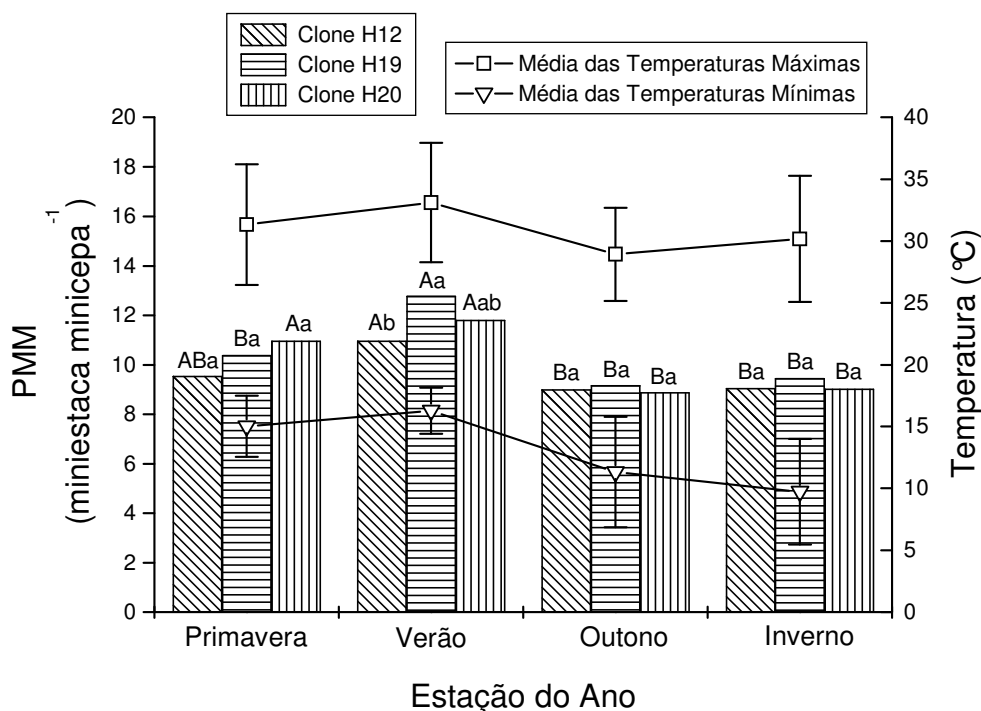
GL = graus de liberdade, CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental, minies. = miniestaca, minic. = minicepa.

Os valores do CV<sub>exp.</sub> para a PMM e PMQ (Tabela 3) estão abaixo dos registrados na literatura para miniestaquia de *Eucalyptus* (WENDLING, 1999; TITON *et al.*, 2003b), o que denota adequada precisão experimental.

A PMM entre os clones não apresentou diferença significativa durante a primavera, resultando em valores médios de 9,54, 10,38 e 10,96 miniestaca por minicepa, respectivamente para os clones H12, H19 e H20. No entanto, durante a estação do verão, o clone H19 apresentou valor médio de 12,78 miniestacas por minicepa, diferindo significativamente do H12, o qual apresentou 10,98 miniestacas por minicepa. Nessa estação, o clone H20 não diferiu dos demais, com valor médio de 11,82 miniestacas coletadas por minicepa (Figura 7).

Nas estações de outono e inverno os clones não apresentaram diferença significativa quanto a PMM, sendo constatada tendência de estabilização da produção de brotações. Durante o outono os clones H12, H19 e H20 apresentaram valores médios de 9,00, 9,18 e 8,88 miniestacas por minicepa e, no inverno essa produção foi de 9,06, 9,46 e 9,02 (Figura 7).

Em termos de comparação da produção de miniestacas para cada clone em relação às estações do ano, durante o verão, a PMM dos clones H12 e H20 não variou significativamente em comparação com a observada na primavera, no entanto, diferiu do outono e inverno. O clone H19 apresentou a maior produção de miniestacas por minicepa durante o verão, a qual diferiu significativamente das demais estações (Figura 7).



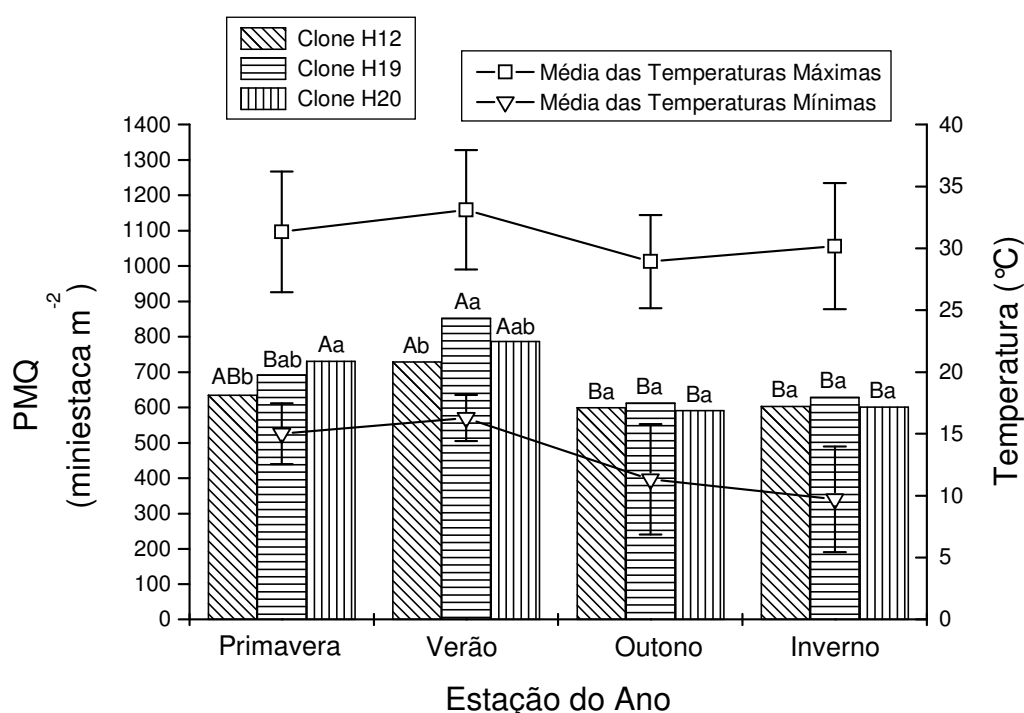
**FIGURA 7** - Variação da produção de miniestacas por minicepa (PMM) de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* em função da estação do ano. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para o mesmo clone entre as diferentes estações do ano e letras minúsculas entre os clones dentro da mesma estação do ano não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Quanto a produção de miniestacas por metro quadrado (PMQ) o clone H20 apresentou valor médio de 732,1 miniestacas  $m^{-2}$  na estação da primavera, diferindo significativamente do H12, o qual apresentou 635,42 miniestacas  $m^{-2}$ . Já o clone H19 não diferiu dos demais, com valor médio de 692,92 miniestacas  $m^{-2}$  (Figura 8).

Durante o verão, novamente ocorreu diferença do comportamento entre os clones. Nessa estação o H19 apresentou 852,64 miniestacas  $m^{-2}$ , diferindo do H12, o qual correspondeu a uma PMQ de 729,84. O clone H20 não diferiu significativamente dos demais, resultando em valor médio de 787,88 miniestacas  $m^{-2}$  (Figura 8).

Nas estações de outono e inverno o comportamento da PMQ (Figura 8) foi muito semelhante ao registrado para a PMM (Figura 7), onde nessas estações não existiu diferença estatística entre os clones. Durante o outono, o H12 apresentou 600,48 miniestacas  $m^{-2}$ , o H19 apresentou 612,86 miniestacas  $m^{-2}$  e o H20 valor médio de 592,38 miniestacas  $m^{-2}$ . No inverno os valores da PMQ foram de 604,22, 629,36 e 602,48, respectivamente para os clones H12, H19 e H20 (Figura 8).

Ao comparar a variação da PMQ do clone H12 entre as estações do ano, verifica-se que não existiu diferença entre a primavera e o verão, no entanto, a PMQ durante o verão diferiu com as registradas no outono e inverno. O clone H20 não apresentou diferença da PMQ na primavera e verão, porém ambas as estações diferiram dos valores registrados durante o outono e inverno. O H19 foi o único clone que apresentou o máximo valor de PMQ durante o verão, diferindo significativamente das demais estações do ano (Figura 8).



**FIGURA 8** - Variação da produção de miniestacas por metro quadrado (PMQ) de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* em função da estação do ano. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para o mesmo clone entre as diferentes estações do ano e letras minúsculas entre os clones dentro da mesma estação do ano não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Segundo Alfenas *et al.* (2004) a coleta seletiva e contínua de propágulos para o enraizamento depende muito da temperatura, intensidade luminosa e fotoperíodo nas diferentes estações do ano, as quais são pronunciadas especialmente em regiões subtropicais, como no sul do Brasil. Esse fato também está de acordo com Eldridge *et al.* (1994) quanto a produção de estacas em regiões de clima temperado, onde a emissão de brotações pode variar em função das condições meteorológicas.

Possivelmente, esses fatores podem ter sido determinantes para os resultados obtidos no presente estudo, pois em termos gerais, fica evidente que a produção de miniestacas acompanhou a variação da temperatura ao longo das estações do ano (Figuras 7 e 8).

A PMM e a PMQ apresentaram correlação significativa com a variação da média das temperaturas máximas ( $T_{\text{máx}}$ ), temperaturas médias ( $T_{\text{méd}}$ ) e temperaturas mínimas ( $T_{\text{mín}}$ ) registradas na estufa de polietileno (Anexo 3). Esse fato indica alta sensibilidade dessas características as variações térmicas, influenciando significativamente o padrão de comportamento da produção de miniestacas. Contudo, deve-se considerar outros fatores como o fotoperíodo e intensidade luminosa, os quais não foram monitorados no presente estudo.

Pode-se verificar que os maiores valores da PMM (Figura 7) e a PMQ (Figura 8) foram registrados durante a primavera e o verão, com redução nas estações de outono e inverno, as quais foram acompanhadas pela demasiada queda das médias das temperaturas máximas, principalmente, das mínimas (Anexo 1). Resultados semelhantes foram registrados por Rosa (2006) que verificou, a partir da 9ª coleta de brotações, decréscimo do número de miniestacas de *E. dunnii* produzidas ao dia com a redução dos valores médios das temperaturas máximas e mínimas, independente do tratamento testado.

Estudos desenvolvidos por Cunha (2006) reforçam que as condições meteorológicas condicionam significativamente a produção de miniestacas por minicepa. Em seus trabalhos, o autor observou que o aumento da temperatura no leito de cultivo, ocasionado pela época do ano, favoreceu positivamente a produção de miniestacas, independente do tipo de minijardim clonal (leito de areia ou tubete).

No entanto, esses efeitos também são dependentes do genótipo, onde o aumento ou decréscimo da produção pode variar de maneira diferenciada. Notadamente, esse efeito foi constatado por Gatti (2002) para a espécie *Tectona grandis* (teca), onde a produção de propágulos vegetativos quanto o enraizamento das miniestacas variaram significativamente em função da época do ano e das condições climáticas do local. No entanto, para as espécies *Calycophyllum spruceanum* (pau mulato) e *Cariniana estrellensis* (jequitibá) esse efeito não ocorreu.

Na miniestaquia de *Eucalyptus* a produção de brotações varia muito conforme as condições de trabalho. Cunha, Wendling e Souza Junior (2005) observaram produção média de 8,1 miniestacas por minicepa ao estudar a

propagação vegetativa de *E. benthamii* em sistema de canaletão, com intervalos entre coletas variando de 25 a 30 dias. Em outro estudo, Souza Junior e Wendling (2003) observaram variação de 1,7 a 2,6 miniestacas por minicepa nas primeiras coletas de propágulos efetuadas para *E. dunnii*. Titon *et al.* (2003b) observaram valor médio de 9,7 miniestacas por minicepa para 4 clones de *E. grandis*, dentro de 8 coletas efetuadas, sendo superior a produção de miniestacas ao comparar com a microestaquia, que foi de 8,5 por microcepa.

Wendling, Xavier e Paiva (2003) observaram comportamento variável em função do clone, sendo que a produção oscilou de 2,0 a 9,7 miniestacas por minicepa, porém sem apresentar uma tendência clara. Os autores sugeriram que esse comportamento pode estar associado a necessidade de adaptação inicial das minicepas ao sistema de hidroponia, bem como, a quebra de dominância apical após a poda. Portanto, após algumas coletas, as gemas dormentes tornaram-se reativas, resultando em maior estímulo ao crescimento, e melhor ajuste ao manejo do minijardim clonal com o decorrer das coletas.

Em termos gerais, a média de produção de miniestaca por minicepa variou em níveis semelhantes e, em certos momentos, em função de cada estação, superou os valores registrados por outros autores na miniestaquia para o gênero *Eucalyptus*. Nas estações da primavera e verão foram observados os maiores índices de produção de miniestacas, sendo que o outono e inverno foram acompanhados dos menores valores médios de produção de miniestacas.



## 3.2 SOBREVIVÊNCIA E ENRAIZAMENTO DE MINIASTACAS

### 3.2.1 Sobrevivência e enraizamento de miniestacas em função das coletas

Quanto ao enraizamento ao longo das coletas de propágulos, houve interação ( $p < 0,01$ ) entre os fatores testados para a sobrevivência das miniestacas durante a saída da casa de vegetação (SSCV), saída da casa de sombra (SSCS) e a sobrevivência em área de pleno sol (SAPS) (Tabela 4).

**TABELA 4** - Resumo da análise de variância para as características da sobrevivência das miniestacas durante saída da casa de vegetação (SSCV), sobrevivência na saída da casa de sombra (SSCS) e a sobrevivência em área de pleno sol (SAPS) de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*.

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios		
		SSCV <sup>(1)</sup>	SSCS <sup>(1)</sup>	SAPS <sup>(1)</sup>
		----- (%) -----		
Clone (CL)	2	0,2270**	0,2289**	0,2319**
Coleta (COL)	25	0,3295**	0,9846**	0,9142**
CL x COL	50	0,0284**	0,0473**	0,0510**
Resíduo	312	0,0052	0,0152	0,0120
Média	-	67,07	24,98	19,30
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	15,22	34,45	36,01

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

<sup>(1)</sup> dados transformados por  $\sqrt{\frac{n}{100}}$  ao nível de 5% de probabilidade de erro.

GL = graus de liberdade, CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental.

Os valores do CV<sub>exp.</sub> da SSCV, SSCS e SAPS (Tabela 4) encontram-se próximos aos padrões registrados na literatura para miniestaquia de *Eucalyptus* (WENDLING, 1999; TITON, 2001; WENDLING, 2002; TITON *et al.*, 2003a; ROSA, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2007), indicando adequada precisão experimental.

Devido ao elevado número de coletas, o que levou a comparação entre períodos climáticos muito distintos, o teste de comparação de médias por Scott-Knott, aplicado ao experimento como um todo, revelou uma variação muito grande no comportamento dos clones, o que aumentou a complexidade e dificultou a interpretação dos dados. Portanto, embora tenha sido constatada interação entre os fatores testados para as características da SSCV, SSCS e SAPS (Tabela 4), optou-

se por apresentar apenas os valores médios em gráficos de colunas para cada estação do ano, a fim de facilitar a interpretação.

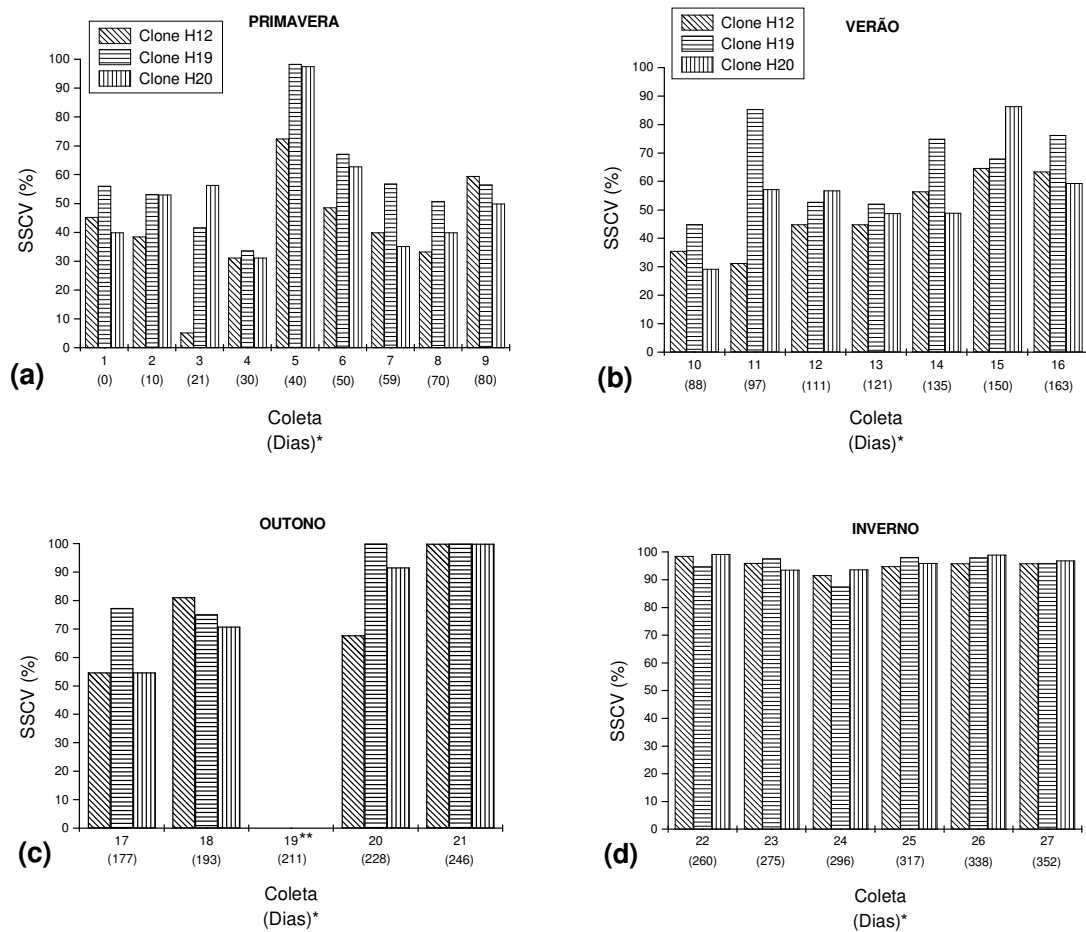
A SSCV dos clones apresentou grande variação nas estações da primavera (Figura 9a) e verão (Figura 9b), com valores de alta sobrevivência, seguidos de queda repentina, em que na maioria das vezes, os valores foram inferiores a 70% de sobrevivência.

Nas estações consideradas mais frias, existiu efeito inverso, resultando nos maiores valores quanto a SSCV. No outono (Figura 9c) ocorreu um aumento gradual da sobrevivência das miniestacas a partir da 17<sup>ª</sup> até a 21<sup>ª</sup> coleta. No entanto, os melhores valores médios observados para a SSCV ocorreram durante a estação inverno (Figura 9d), onde os índices mantiveram-se próximos a 100% de sobrevivência de miniestacas, independente do clone avaliado.

Esse fato pode estar relacionado a variação das condições ambientais conferida pela sazonalidade na estrutura adotada para o enraizamento, a qual, nas estações mais quentes, manteve valores elevados das médias das temperaturas máximas, médias e mínimas (Anexo 2). Possivelmente, as elevadas temperaturas podem ter ocasionado estresse aos propágulos e, dessa forma, pode ter ocasionado aumento de mortalidade, tendo em vista a maior sensibilidade das miniestacas às condições ambientais nos primeiros dias após a entrada na estrutura de enraizamento.

Brondani *et al.* (2007), ao estudarem a miniestaquia como alternativa de clonagem para *Ilex paraguariensis*, observaram que a constante elevação da média das temperaturas máximas, acima da faixa de 30 °C na casa de vegetação sem controle das condições ambientais, resultou em fatores negativos para o enraizamento das miniestacas.

Rosa (2006) também observou que variações da temperatura durante um único dia, comuns nas épocas mais quentes na região de Colombo - PR, podem ter influenciado negativamente a SSCV de miniestacas de *E. dunnii*. No entanto, essas respostas também podem ser condicionadas pelas características de cada espécie.



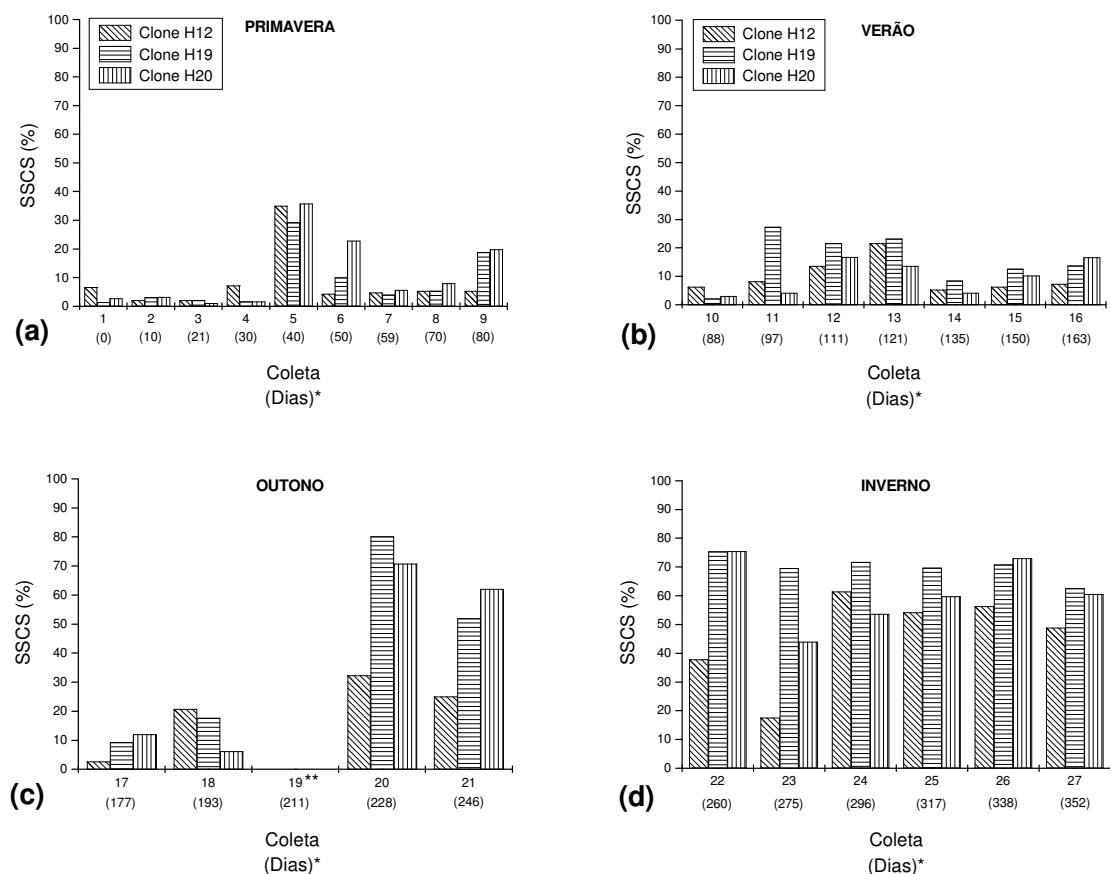
**FIGURA 9** - Variação da sobrevivência de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni* durante a saída da casa de vegetação (SSCV), ao longo de 352 dias de coletas sucessivas de brotações. (a): sobrevivência de miniestacas na estação da primavera, (b): verão, (c): outono e (d): inverno. \* valores entre parênteses referem-se ao intervalo de dias entre as coletas. \*\* dados não coletados em função da manutenção e limpeza da casa de vegetação.

As miniestacas apresentaram comportamento muito semelhante quanto as características da SSCS (Figura 10) em relação as mensuradas durante a SAPS (Figura 11). Contudo os valores médios foram inferiores aqueles obtidos na casa de vegetação. Esse fato também foi observado por Almeida *et al.* (2007), pois as respostas dos propágulos em área de pleno sol são reflexos da aclimação das miniestacas logo após a saída da casa de vegetação.

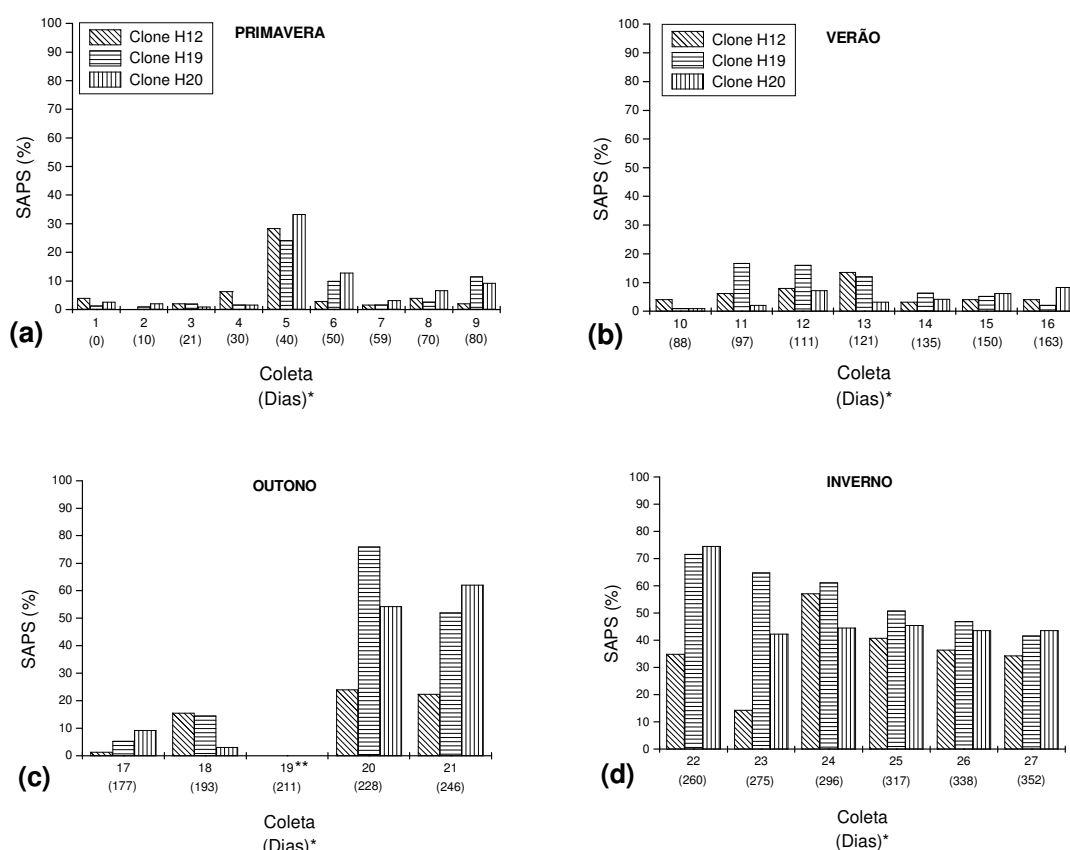
Em termos gerais, os índices de sobrevivência registrados na casa de sombra foram inferiores a 20% na primavera (Figura 10a) e a 25% no verão (Figura 10b), sendo registrados valores inferiores a 10% em algumas coletas. Durante a SAPS os índices manteram-se abaixo de 10% na primavera (Figura 11a) e inferiores a 15% no verão (Figura 11b). Exceção dada a 5ª coleta, onde os valores variaram entre 25% a 40% (Figuras 10a e 11a). Esse fato pode estar relacionado,

possivelmente, a menor variação das condições ambientais na época da execução da miniestaquia, tanto na estufa que continha as minicepas quanto nos primeiros dias após a entrada das miniestacas na casa de vegetação automatizada.

No outono ocorreu aumento dos valores da SSCS (Figura 10c) e da SAPS (Figura 11c). Posteriormente, a medida que se aproximou o inverno (a partir da 20ª até a 21ª coleta), o qual é caracterizado por um decréscimo gradual da temperatura, os valores da sobrevivência tenderam a aumentar. Os melhores resultados quanto a SSCS (Figura 10d) e SAPS (Figura 11d) foram registrados no inverno, onde os valores dessas características variaram entre 40% a 70% na maioria das vezes.



**FIGURA 10** - Variação da sobrevivência de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* durante a saída da casa de sombra (SSCS), ao longo de 352 dias de coletas sucessivas de brotações. (a): sobrevivência de miniestacas na estação da primavera, (b): verão, (c): outono e (d): inverno. \* valores entre parênteses referem-se ao intervalo de dias entre as coletas. \*\* dados não coletados em função da manutenção e limpeza da casa de vegetação.



**FIGURA 11** - Variação do enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni* durante avaliação da sobrevivência em área de pleno sol (SAPS), ao longo de 352 dias de coletas sucessivas de brotações. (a): sobrevivência de miniestacas na estação da primavera, (b): verão, (c): outono e (d): inverno. \* valores entre parênteses referem-se ao intervalo de dias entre as coletas. \*\* dados não coletados em função da manutenção e limpeza da casa de vegetação.

Em termos gerais, existiu tendência de aumento dos valores da SSCV (Figura 9), SSCS (Figura 10) e SAPS (Figura 11) a partir da 1ª até a 22ª coleta, onde os melhores valores para essas características foram observados da 20ª até a 27ª coleta, as quais compreendem as estações de outono e inverno.

Outro comportamento que merece destaque refere-se a tendência de redução dos valores de enraizamento ao longo do inverno, sendo mais pronunciado a medida que se aproximou do início da primavera (Figura 11d). Esse fato pode estar relacionado a elevação dos valores da temperatura (Anexo 2), o que indica, mais uma vez, a provável sensibilidade do material genético a elevação da temperatura.

Em termos de controle ambiental da casa de vegetação automatizada, ajustes da temperatura para valores menores ao trabalhado, a qual foi mantida a valores inferiores a 30 °C, podem proporcionar melhores resultados, pois, ao que

tudo indica, a faixa de temperatura considerada ideal para o enraizamento dos clones, possivelmente, estaria compreendida abaixo desse valor. No entanto, seriam necessários estudos mais aprofundados para comprovar essa hipótese.

### 3.2.2 Sobrevivência e enraizamento de miniestacas em função das estações do ano

Houve interação ( $p < 0,01$ ) entre os fatores testados para as características da sobrevivência na saída da casa de vegetação (SSCV), saída da casa de sombra (SSCS) e sobrevivência em área de pleno sol (SAPS), ou seja, os clones apresentaram comportamento distinto em cada estação do ano (Tabela 5).

**TABELA 5** - Resumo da análise de variância para as características da sobrevivência das miniestacas durante saída da casa de vegetação (SSCV), sobrevivência na saída da casa de sombra (SSCS) e sobrevivência em área de pleno sol (SAPS) de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*.

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios		
		SSCV	SSCS	SAPS <sup>(1)</sup>
		----- (%) -----		
Clone (CL)	2	566,99**	825,17**	0,046**
Estação (EST)	3	6.812,74**	7.751,45**	0,702**
CL x EST	6	71,51**	158,88**	0,012**
Resíduo	48	15,41	9,48	0,001
Média	-	70,20	28,49	22,67
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	5,59	10,81	7,37

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

<sup>(1)</sup> dados transformados por  $\sqrt{\frac{n}{100}}$  ao nível de 5% de probabilidade de erro.

GL = graus de liberdade, CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental.

Os valores do CV<sub>exp.</sub> em relação a SSCV, SSCS e SAPS (Tabela 5) estão condizentes aos registrados na literatura para miniestaquia de *Eucalyptus* (WENDLING, 1999; TITON, 2001; WENDLING, 2002; TITON *et al.*, 2003a; ROSA, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2007), o que denota boa precisão experimental. Convém salientar que o valor do CV<sub>exp.</sub> para a SAPS esteve abaixo dos valores encontrados na literatura, devido a necessidade de transformação dos dados para o procedimento da ANOVA.

Durante a estação da primavera, os clones H19 e H20 não apresentaram diferença significativa quanto a SSCV, com valores médios de 57,08% e 51,80%,

respectivamente. No entanto, diferiram do H12, o qual apresentou o menor valor médio para essa variável, com estimativa de 41,57% para a sobrevivência de miniestacas (Figura 12).

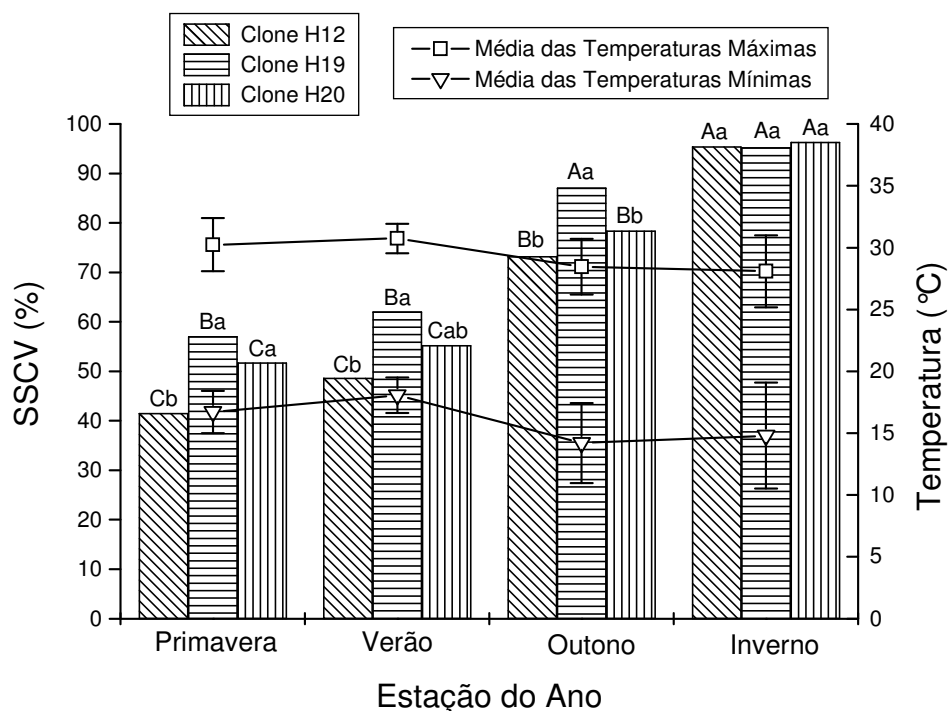
No verão, o clone H19 apresentou valor médio de 62,04% de SSCV, diferindo do H12, o qual correspondeu a 48,69%. A média da SSCV para o clone H20 foi de 55,24%, não sendo constatada diferença significativa em relação aos demais clones.

Durante a estação de outono, o clone H19 foi superior, apresentando 87,13% de sobrevivência de miniestacas, diferindo significativamente do H12 e H20, os quais se mostraram mais sensíveis a essa estação, com 73,26% e 78,44% de SSCV, respectivamente.

Contudo, durante a estação de inverno foram registrados os maiores índices de sobrevivência das miniestacas. Os clones apresentaram comportamento semelhante, não diferindo significativamente quanto a SSCV, com valores médios de 95,47%, 95,28% e 96,38%, respectivamente para os clones H12, H19 e H20.

Ao comparar o comportamento de cada clone em função das diferentes estações do ano, percebe-se que os clones H12 e H20 apresentaram os menores valores para a SSCV durante as estações da primavera e verão. No outono, os valores ficaram em níveis intermediários. Porém, os maiores valores da sobrevivência das miniestacas, para ambos os clones, ocorreram apenas no inverno (Figura 12).

Com relação ao clone H19, pode-se observar que os maiores índices para a SSCV ocorreram nas estações de outono e inverno, onde os valores médios não diferiram significativamente. Contudo, os menores valores para a SSCV foram registrados nas estações da primavera e verão, as quais diferiram significativamente dos valores ocorridos nas estações mais frias (outono e inverno) (Figura 12).



**FIGURA 12** - Variação da sobrevivência de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* durante a saída da casa de vegetação (SSCV) em função da estação do ano. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para o mesmo clone entre as diferentes estações do ano e letras minúsculas entre os clones dentro da mesma estação do ano não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

A SSCV mostrou-se inversamente proporcional quanto ao efeito da temperatura na estrutura adotada para o enraizamento das miniestacas. Percebe-se que durante as estações da primavera e verão, nas quais foram registrados os maiores valores das temperaturas máximas, médias e mínimas (Anexo 2), ocorreram os menores valores para a SSCV. Ao passo que nas estações de outono e inverno, onde existiu um decréscimo dos valores das temperaturas, os clones apresentaram os maiores valores para essa característica.

Ao interpretar a SSCS (Figura 13), pode-se observar que na primavera os clones não diferiram significativamente, apresentando valores médios de 8,08%, 8,38% e 11,18%, respectivamente para os clones H12, H19 e H20. No entanto, a partir do verão, o comportamento foi diferenciado. Nessa estação, o clone H19 apresentou o maior valor médio, com 17,99%, diferindo do H12 e H20, os quais apresentaram valores médios de 9,79% e 9,83%, respectivamente.

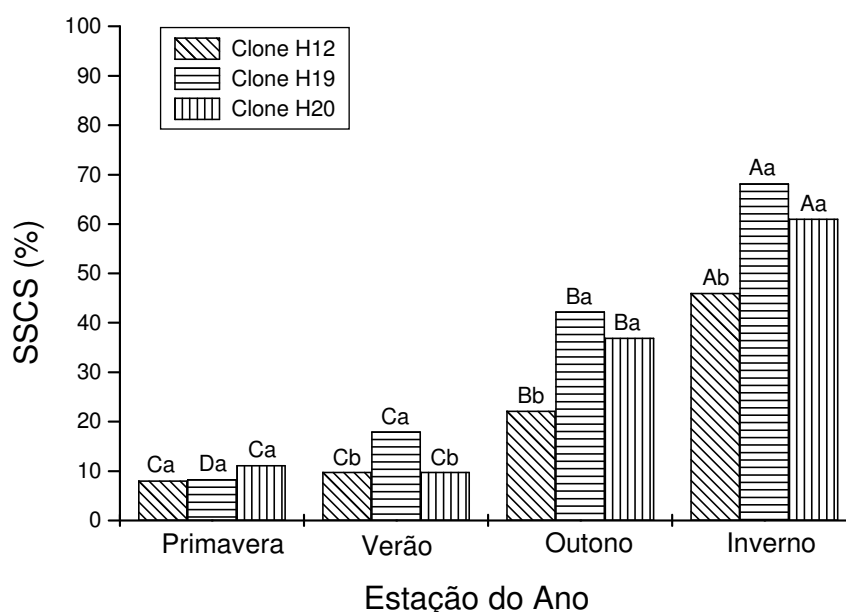
Na estação do outono, os clones H19 e H20, com 42,25% e 36,91% diferiram significativamente do H12, o qual resultou no menor valor médio, com



22,22% de sobrevivência de miniestacas. Esse comportamento foi semelhante na estação do inverno, onde os clones H19, com 68,18% e H20, com 61,04%, novamente foram superiores ao H12, que apresentou média de 46,05% de SSCS (Figura 13).

Ao comparar os valores médios da SSCS de cada clone em relação as estações do ano, verifica-se que os clones H12 e H20 apresentaram comportamento semelhante. Os maiores valores observados para essa característica ocorreram durante a estação de inverno, sendo os menores registrados na primavera e verão, as quais não diferiram significativamente. No outono foram registrados valores intermediários em comparação as demais estações do ano.

O clone H19 foi o único que apresentou comportamento diferenciado em cada estação do ano, com aumento progressivo da SSCS com o passar do tempo. O maior valor médio foi registrado na estação inverno, sendo que o menor ocorreu durante a primavera (Figura 13).



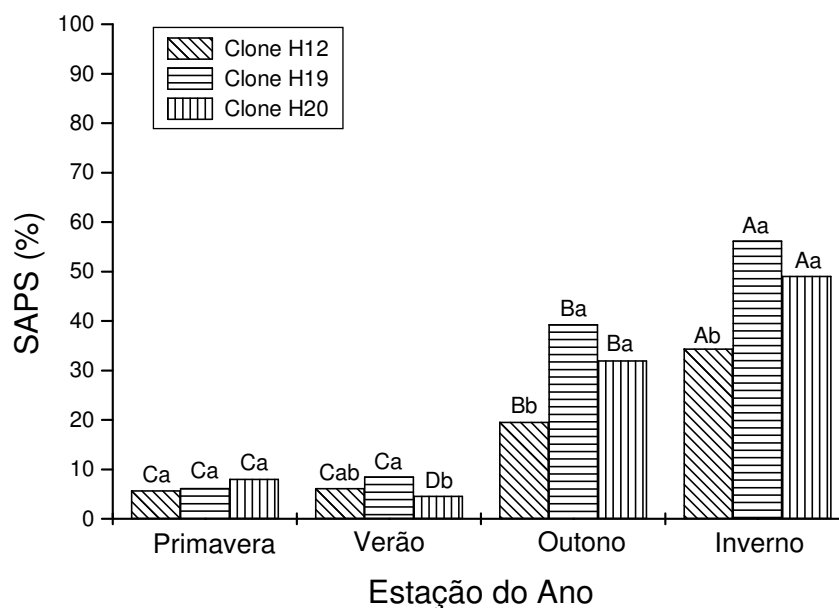
**FIGURA 13** - Variação da sobrevivência de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* durante a saída da casa de sombra (SSCS) em função da estação do ano. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para o mesmo clone entre as diferentes estações do ano e letras minúsculas entre os clones dentro da mesma estação do ano não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Quanto a sobrevivência em área de pleno sol (SAPS), na primavera não existiu diferença significativa entre os clones, com médias de 5,71%, 6,22% e 8,09%, respectivamente para os clones H12, H19 e H20. No verão, o clone H19, o qual apresentou 8,50% de SAPS, diferiu significativamente do clone H20, que apresentou valor médio de 4,62%. O clone H12, com média de 6,20% não diferiu significativamente em relação aos demais (Figura 14).

Nas estações de outono e inverno, os clones H19 e H20, os quais apresentaram superioridade quanto a SAPS, diferiram significativamente do clone H12. Na estação de outono os clones H19 e H20 apresentaram valores médios de 39,38% e 32,04%, sendo que o H12 apresentou média de 19,59%. No inverno as médias foram de 56,20% e 49,12%, respectivamente para os clones H19 e H20 e, de 34,40% para o clone H12. Dessa forma, o clone H12 apresentou tendência de ser um material genético com baixa capacidade rizogênica em comparação aos clones H19 e H20 (Figura 14).

Ao comparar a SAPS de cada clone em relação as diferentes estações do ano, pode-se verificar que os clones H12 e H19 apresentaram comportamento semelhante. Os menores valores de miniestacas enraizadas foram registrados durante a primavera e verão, onde não foi constatada diferença significativa. A maior porcentagem de enraizamento foi verificada no inverno, seguido do outono.

No entanto, o clone H20 apresentou valores de enraizamento diferenciado ao longo das estações do ano. O maior valor de miniestacas enraizadas em área de pleno sol ocorreu no inverno seguido do outono. Os menores valores da SAPS foram verificados durante a primavera e verão (Figura 14).



**FIGURA 14** - Variação do enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dun nii* durante avaliação da sobrevivência em área de pleno sol (SAPS) em função da estação do ano. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para o mesmo clone entre as diferentes estações do ano e letras minúsculas entre os clones dentro da mesma estação do ano não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Fatores como as condições fisiológicas das plantas doadoras de brotações, bem como, as condições ambientais as quais são submetidos os propágulos vegetativos exercem influência determinante no enraizamento (ELDRIDGE *et al.*, 1994). Além disso, Zuffellato-Ribas e Rodrigues (2001a) e Alfenas *et al.* (2004) salientam que as oscilações do fotoperíodo e da temperatura ao longo da época do ano apresentam-se como fatores decisivos na indução de raízes em propágulos vegetativos.

A SSCV, SSCS e SAPS apresentaram alta correlação quanto aos valores das médias das T<sub>máx</sub>, T<sub>méd</sub> e T<sub>mín</sub> registradas na casa de vegetação automatizada (Anexo 4). Esse fato denota que as variações da temperatura no leito inicial de enraizamento apresentam grande influência no enraizamento das miniestacas e, de certa forma, seus efeitos refletiram diretamente nas fases de aclimatização e rustificação das mudas.

Além disso, foi constatada correlação significativa da SAPS com a SSCV e SSCS (Anexo 4), corroborando com os resultados encontrados por Wendling (1999) e Titon (2001), indicando confiabilidade da avaliação das características de sobrevivência.

Apesar dos avanços, existem poucos estudos que relacionam a influência dos fatores ambientais na produção de brotos em minijardins clonais, bem como, sobre os processos de enraizamento de miniestacas (ALFENAS *et al.*, 2004). Recentemente, Cunha (2006) verificou que a temperatura influencia o enraizamento de miniestacas, sendo dependente do clone e do tipo de minijardim clonal. Para o minijardim clonal conduzido em leito de areia, a diminuição da temperatura favoreceu o enraizamento, no entanto, em condições de minijardim clonal em sistema de tubetes, o enraizamento foi favorecido pelo aumento da temperatura.

Torres (2003) observou correlação significativa do efeito da sazonalidade com a sobrevivência de miniestacas dentro da casa de vegetação automatizada. Para o clone A (um híbrido de *E. saligna*) foi estimado ganho de 2,60% na sobrevivência de miniestacas durante o verão (estação mais quente) ao comparar com a do inverno. Para o clone B (um híbrido de *E. grandis*) existiu ganho de 1,69% na sobrevivência durante a estação mais quente. O autor salienta que nas condições ambientais da casa de vegetação automatizada, a radiação solar líquida apresentou a maior oscilação ao longo das estações do ano, atribuindo a esse fato, um dos fatores de grande influência nos resultados obtidos.

Na estaquia de *E. benthamii*, Graça, Shimizu e Tavares (1999) observaram baixa porcentagem de enraizamento de estacas, onde o maior valor para essa característica ocorreu durante a primavera, com 31,2% de estacas enraizadas, sendo que na estação outono foi de apenas 26,3%.

Zuffellato-Ribas e Rodrigues (2001b) observaram que a resposta mais favorável quanto ao enraizamento de estacas de *E. grandis*, obtidas de plantas-matrizes de 3 anos de idade, ocorreu na coleta realizada durante a estação inverno, com 64% de enraizamento quando tratadas com 6.000 e 8.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Na primavera ocorreu média de 42% de enraizamento a 8.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB e no verão apenas 6% de estacas enraizaram ao serem tratadas com 4.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Além da influência positiva do fitorregulador, os autores referem-se ao aumento da temperatura durante o inverno, a qual foi anormal naquele ano, um dos fatores que favoreceu a resposta ao enraizamento.

Além disso, a capacidade do propágulo em emitir raízes é característica da interação de fatores que se encontram presentes nas células do tecido vegetal, como substâncias transportáveis produzidas nas folhas e gemas (ZUFFELLATO-RIBAS; RODRIGUES, 2001a). Dessa forma, as variações climáticas sazonais

podem afetar significativamente o estado fisiológico da planta-matriz, podendo sofrer alterações hormonais endógenas, nutricionais e no balanço entre promotores e inibidores do enraizamento (HARTMANN *et al.*, 2002).

Torres (2003) observou que as brotações mais aptas para o emprego da miniestaquia estão diretamente relacionadas ao aumento dos níveis de carboidratos em função da época do ano e do intervalo entre as coletas de brotações. O autor salienta que o aumento da periodicidade entre as coletas aumenta-se a área foliar específica, permitindo assim, maior produção de fotoassimilados e incremento dos níveis endógenos de carboidratos no caule.

Os valores médios de enraizamento das miniestacas observados nas estações mais frias (outono e inverno) estão próximos aos valores comumente encontrados na miniestaquia de *Eucalyptus* (WENDLING, 1999; TITON *et al.*, 2003a; SOUZA JUNIOR; WENDLING, 2003; WENDLING; XAVIER, 2005b; ROSA, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2007). No entanto, os valores de enraizamento registrados na primavera e verão (estações mais quentes) (Figura 14) indicam comportamento recalcitrante dos clones, em relação a espécies mais adaptadas a essas condições, como o *E. grandis*.

Outra hipótese estaria ligada em nível de comportamento de genótipo, em que praticamente todas as espécies de clima subtropical, as quais são tolerantes ao frio, são consideradas recalcitrantes ao enraizamento, o que dificulta o uso dessas fontes genéticas em programas clonais visando a resistência ao frio (ASSIS; MAFIA, 2007).

A exemplo, essa característica é observada para as espécies de *E. nitens*, *E. regans* (ELDRIDGE *et al.*, 1994), *E. benthamii* (GRAÇA; SHIMIZU; TAVARES, 1999) e *E. dunnii* (COOPER; GRAÇA, 1987; COOPER; GRAÇA, 1994) as quais são difíceis de enraizar ao comparar com espécies de clima tropical, como o *E. grandis*, *E. urophylla* e seus híbridos (ASSIS; MAFIA, 2007). Dessa forma, o fato das espécies parentais apresentarem comportamento recalcitrante aos processos rizogênicos, também pode ter influenciado os baixos índices de enraizamento.

No geral, em termos da SSCV (Figura 12), SSCS (Figura 13) e SAPS (Figura 14) das miniestacas, os clones mostraram-se sensíveis ao efeito da sazonalidade. Nas estações onde foram registrados os maiores valores médios das temperaturas máximas e mínimas, ou seja, na primavera e verão (estações mais quentes), ocorreram as menores porcentagens de enraizamento. Efeito contrário

existiu nas estações do outono e inverno (estações mais frias), onde, com o decréscimo dos valores da temperatura foi seguido de aumento dos índices de sobrevivência.

### 3.3 EFEITO DO ÁCIDO INDOLBUTÍRICO NO ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS

Devido a ocorrência de elevada mortalidade de miniestacas nas diferentes épocas do ano, utilizaram-se apenas os dados da 22<sup>ª</sup> coleta (mês de junho) correspondente a estação inverno, pois a partir desta, começou a ser observado enraizamento satisfatório das miniestacas.

Houve interação ( $p < 0,05$ ) entre os fatores testados apenas para a característica da sobrevivência das miniestacas em área de pleno sol (SAPS), ou seja, os clones responderam de maneira diferenciada quanto a SAPS em função da aplicação de AIB (Tabela 6).

Existiu efeito significativo ( $p < 0,01$ ) para o fator clone em relação as características da SSCV, SSCS e CMB. Contudo, não foi constatado efeito significativo quanto ao número de brotações (NB).

De acordo com a análise de regressão para o efeito da aplicação do fitorregulador AIB, ajustou-se equação linear apenas para as características da SSCV ( $p < 0,05$ ) e SSCS ( $p < 0,01$ ) (Anexo 5).

**TABELA 6** - Resumo da análise de variância para as características da sobrevivência na saída da casa de vegetação (SSCV), saída da casa de sombra (SSCS), sobrevivência em área de pleno sol (SAPS), número de brotações por muda (NB) e comprimento médio de brotações por muda (CMB) de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*.

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios				
		SSCV	SSCS	SAPS	NB <sup>(1)</sup> (muda <sup>-1</sup> )	CMB <sup>(1)</sup> (cm muda <sup>-1</sup> )
		----- (%) -----				
Clone (CL)	2	851,75**	5.422,74**	4.508,46**	0,0048 <sup>ns</sup>	0,0563**
AIB	4	172,82*	1.006,62**	798,49**	0,0084 <sup>ns</sup>	0,0027 <sup>ns</sup>
CL x AIB	8	62,59 <sup>ns</sup>	198,64 <sup>ns</sup>	204,80*	0,0049 <sup>ns</sup>	0,0019 <sup>ns</sup>
Resíduo	60	61,23	122,43	96,59	0,0055	0,0036
Média	-	94,09	41,90	34,48	1,45	1,56
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	8,32	26,40	28,51	20,06	15,40

<sup>ns</sup> não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

\* e \*\* significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente, pelo teste F.

<sup>(1)</sup> dados transformados por  $\sqrt{\frac{n}{10}}$  ao nível de 5% de probabilidade de erro.

GL = graus de liberdade, CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental.

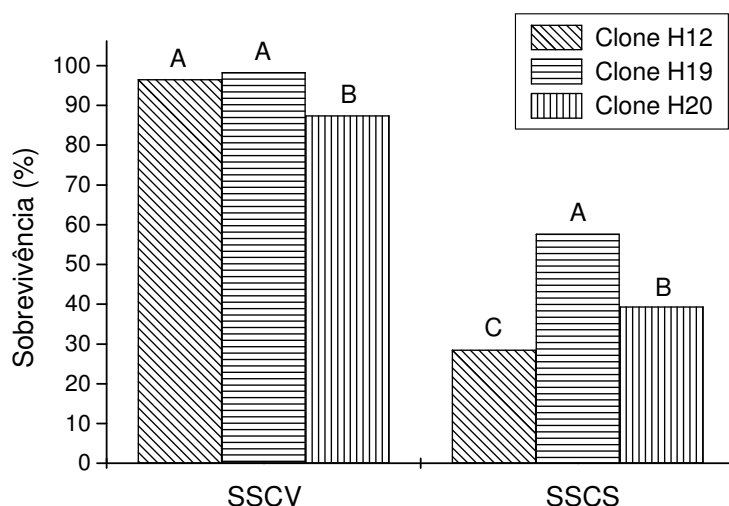
Os valores do CV<sub>exp.</sub> referentes as características amostradas (Tabela 6) estão de acordo com os registrados na literatura para miniestaquia de *Eucalyptus* (WENDLING, 1999; TITON, 2001; WENDLING, 2002; TITON *et al.*, 2003a; ROSA, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2007), indicando que a precisão do experimento encontra-se dentro dos padrões existentes para essa técnica de clonagem.

Os valores médios da sobrevivência das miniestacas dos clones H12 e H19 durante a saída da casa de vegetação (SSCV), de 96,57% e 98,29%, respectivamente, diferiram significativamente da sobrevivência registrada para o clone H20, que apresentou valor médio de 87,43% de miniestacas vivas durante esse período (Figura 15). Esses resultados corroboram com os obtidos por Wendling *et al.* (2000), Souza Junior e Wendling (2003), Titon *et al.* (2003a), Wendling e Xavier (2005b), Rosa (2006) e Almeida *et al.* (2007), onde foi constatado alta sobrevivência de miniestacas nessa fase.

O fato dos percentuais de sobrevivência de miniestacas apresentarem-se altos durante a SSCV advém do controle das condições ambientais no interior da casa de vegetação, as quais são favoráveis à manutenção da sobrevivência dos propágulos vegetativos (WENDLING; XAVIER, 2005b). Portanto, a elevada sobrevivência de miniestacas durante a saída da casa de vegetação indica que os controles da temperatura e umidade relativa do ar foram adequados.

Apesar da elevada sobrevivência das miniestacas na saída da estrutura de enraizamento, ocorreu elevada mortalidade durante a fase de aclimação em casa de sombra. Nessa fase, os clones apresentaram comportamento diferenciado, sendo que o maior valor médio da SSCS foi observado para o H19 que apresentou 57,71% de miniestacas vivas, seguido do clone H20, com 39,43%. O clone H12 demonstrou maior sensibilidade durante essa fase de aclimação, resultando no menor valor registrado de miniestacas vivas, com apenas 28,57% de sobrevivência (Figura 15).

Segundo Wendling e Xavier (2005b) a redução do percentual de sobrevivência das miniestacas na fase de saída da casa de sombra pode estar relacionada a mudanças das condições ambientais, onde os efeitos de oscilações hídricas e lumínicas ocorridas na área de aclimação proporcionam maiores estresses as miniestacas.



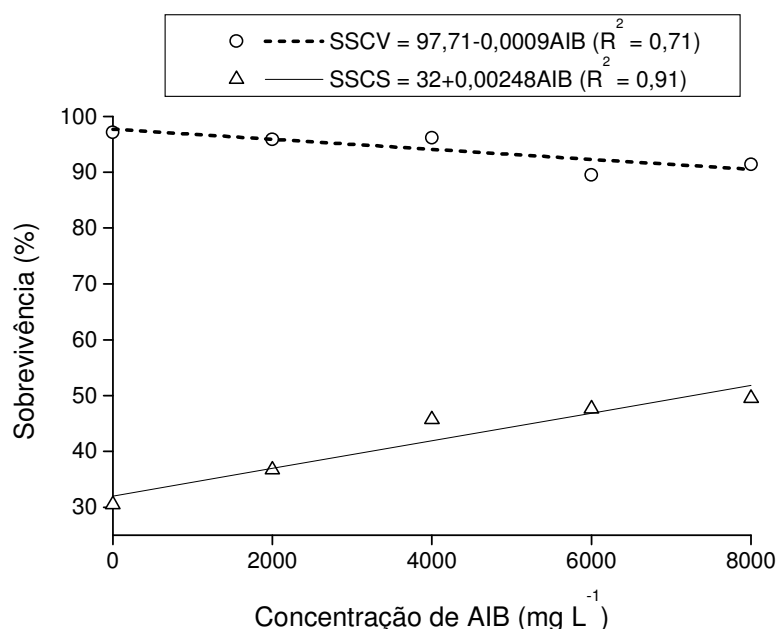
**FIGURA 15** - Variação da sobrevivência de miniestacas dos clones H12, H19 e H20 de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* durante a saída da casa de vegetação (SSCV) e saída da casa de sombra (SSCS) em função das concentrações de AIB. Médias seguidas por mesma letra dentro de cada fase não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Em relação as concentrações do fitorregulador, independente do clone, a aplicação de AIB apresentou uma tendência de proporcionar mortalidade de miniestacas durante a SSCV, ao comparar com os valores médios da testemunha. De maneira geral, quanto maior foi a concentração, maior foi a mortalidade registrada (Figura 16). Entretanto, essa diferença foi muito pequena, sendo que a estimativa da sobrevivência de miniestacas para o tratamento controle (ausência de



fitorregulador) foi de 97,71% e na maior concentração de AIB ( $8.000 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi de 90,51%.

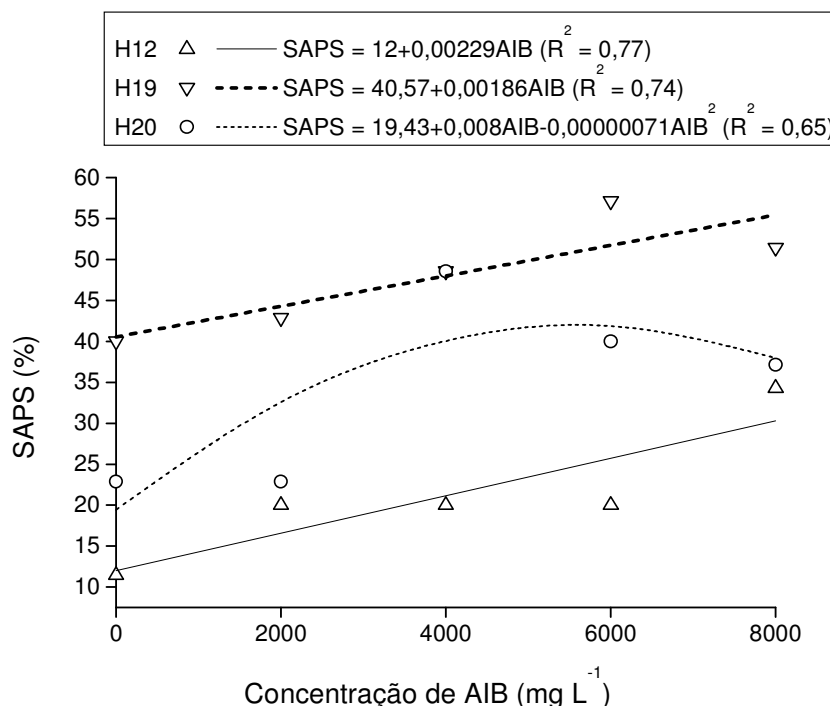
No entanto, durante o período de aclimação das miniestacas em casa de sombra (SSCS), ocorreu efeito inverso ao observado na SSCV em relação as concentrações de AIB. O aumento das concentrações do fitorregulador de crescimento promoveu resposta positiva quanto a sobrevivência das miniestacas. Importante observar que durante a SSCS, foi registrada uma elevada mortalidade das miniestacas em relação aos valores observados na SSCV, passando a valores inferiores a 50% de sobrevivência de miniestacas, independente da concentração de AIB testada (Figura 16).



**FIGURA 16** - Variação da sobrevivência de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* durante a saída da casa de vegetação (SSCV) (aos 35 dias) e saída da casa de sombra (SSCS) (aos 56 dias) em função das concentrações de AIB.

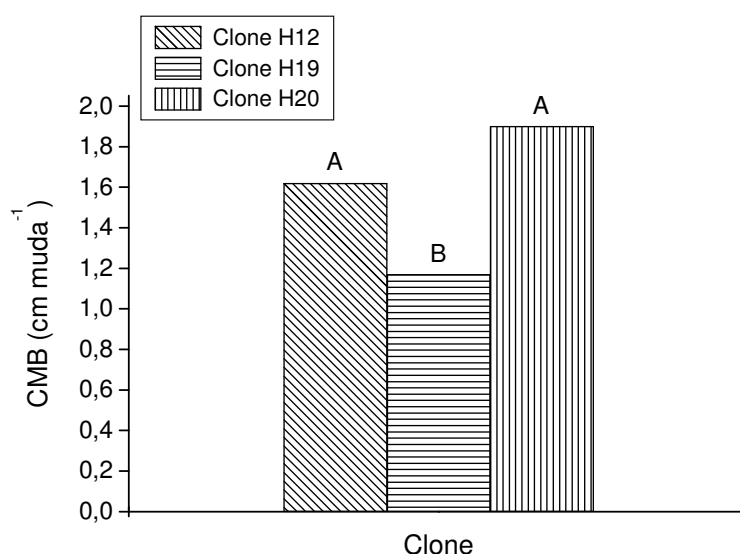
Durante avaliação da sobrevivência das miniestacas em área de pleno sol (SAPS), os clones apresentaram comportamento distinto em função das aplicações de AIB. Embora os clones H12 e H19 tenham apresentado diferentes valores de porcentagem de miniestacas enraizadas, o comportamento foi muito semelhante, com resposta linear crescente (Anexo 6) com o aumento das concentrações de AIB (Figura 17).

Porém, o clone H20 apresentou resposta quadrática crescente (Anexo 6) em função do aumento das concentrações de AIB. De acordo com a equação ajustada para o enraizamento desse clone foi estimado o ponto de máxima eficiência técnica na concentração de 5.633,8 mg L<sup>-1</sup> de AIB, o que promoveu uma estimativa de 41,97% de miniestacas enraizadas do clone H20 (Figura 17).



**FIGURA 17** - Variação do enraizamento de miniestacas dos clones H12, H19 e H20 de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dun nii* durante avaliação da sobrevivência em área de pleno sol (SAPS) em função das concentrações de AIB, aos 86 dias após a miniestaquia.

Na avaliação das mudas em área de pleno sol (86 dias), o comprimento médio de brotos por miniestaca (CMB) apresentou variação entre os diferentes materiais genéticos. Os clones H12 e H20 não diferiram significativamente, apresentando os maiores valores médios, com 1,62 cm e 1,90 cm, respectivamente. O menor valor do CMB foi observado para o clone H19, o qual apresentou 1,17 cm para essa característica, diferindo significativamente dos demais clones testados (Figura 18). Não foi constatada diferença significativa quanto ao número de brotações, onde o valor médio foi de 1,45 brotações por muda aos 86 dias após a miniestaquia (Tabela 6).



**FIGURA 18** - Variação do comprimento médio de brotos por miniestaca (CMB) dos clones H12, H19 e H20 de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* durante avaliação em área de pleno sol, aos 86 dias após a miniestaquia. Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

As respostas dos efeitos do AIB nos processos rizogênicos em estacas são diversas em função da grande variabilidade de ações, as quais estão condicionadas a interação de vários fatores, como o material genético (WENDLING *et al.*, 2000; TITON *et al.*, 2003a; WENDLING; XAVIER, 2005b), forma de veiculação (ALMEIDA *et al.*, 2007), época do ano, temperatura, luminosidade, fotoperíodo, juvenilidade (ZUFFELLATO-RIBAS; RODRIGUES, 2001a; ALFENAS *et al.*, 2004; ASSIS; MAFIA, 2007), dentre outros.

Em certos casos a aplicação de AIB pode promover resultados positivos, como em materiais que apresentam dificuldade ao enraizamento (ALMEIDA *et al.*, 2007). Contudo, a sua aplicação pode não promover incrementos ao enraizamento (SOUZA JUNIOR; WENDLING, 2003) e, em certas concentrações, até causar níveis de toxidez (WENDLING; XAVIER, 2005b). Geralmente, as concentrações consideradas ótimas para a formação de raízes são muito particulares a cada situação.

Almeida *et al.* (2007) estudaram diferentes veiculações de AIB variando nas concentrações de 0 a 6.000 mg L<sup>-1</sup> e observaram que alguns clones de *E. cloeziana*, considerada espécie de difícil propagação vegetativa, apresentaram maior potencial rizogênico das miniestacas somente quando tratadas com as maiores concentrações de fitorregulador de crescimento.

Titon *et al.* (2003a) observaram que as concentrações compreendidas entre 1.000 a 2.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB proporcionaram os melhores índices de enraizamento e sobrevivência de miniestacas para diferentes clones de *E. grandis*. Resultados semelhantes foram constatados por Wendling *et al.* (2000) em que o efeito de AIB foi positivo ao processo de rizogênese na miniestaquia de *Eucalyptus* spp. nas concentrações de 1.000 a 3.000 mg L<sup>-1</sup>. Porém, em outro estudo, Wendling e Xavier (2005b) observaram efeito diferenciado entre os clones na miniestaquia seriada de *Eucalyptus grandis* em função das aplicações de AIB, sendo que em certas características dos clones estudados, foi constatado toxidez nas concentrações acima de 500 mg L<sup>-1</sup> de AIB.

Trabalhando com material juvenil, Souza Junior e Wendling (2003) concluíram que a miniestaquia de *Eucalyptus dunnii* de brotações de origem seminal é tecnicamente viável sem a aplicação de AIB para a promoção do enraizamento, em vista do alto grau de juvenilidade do material utilizado.

De maneira geral, apesar dos valores dos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) dos modelos ajustados terem variado entre 0,65 a 0,77, as equações auxiliaram para expressar uma tendência de comportamento do enraizamento das miniestacas de *E. benthamii* x *E. dunnii* na presença do AIB, o qual promoveu resultados positivos para todos os clones até a concentração de 8.000 mg L<sup>-1</sup>, em comparação a não aplicação.

Aos 126 dias de idade, a maioria das mudas apresentaram-se vigorosas, com boa formação e com emissão da brotação principal em sentido ortotrópico (Figura 19), características essas que são importantes no padrão de qualidade final da muda.



**FIGURA 19** - Mudas dos clones H12, H19 e H20 de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* produzidas pela técnica de miniestaquia, aos 126 dias de idade. Foto: Brondani (2007).

## 4 CONCLUSÕES

- As minicepas apresentaram alto percentual de sobrevivência ao longo de 352 dias de coletas sucessivas de brotações.
- A produção e o enraizamento de miniestacas variaram conforme o clone e mostraram-se muito sensíveis ao efeito da sazonalidade.
- A maior produção de miniestacas por minicepa ocorreu nas estações mais quentes (primavera e verão), e a menor nas estações mais frias (outono e inverno).
- Independente do clone, os melhores índices de enraizamento foram registrados nas estações mais frias (outono e inverno) e os menores nas estações mais quentes (primavera e verão).
- A técnica de miniestaquia pode ser considerada viável para obtenção de mudas dos híbridos testados.
- Os clones responderam de maneira semelhante ao AIB quanto a sobrevivência de miniestacas na saída da casa de vegetação e de sombra.
- A aplicação de AIB influenciou positivamente os processos rizogênicos das miniestacas.
- Para os clones H12 e H19 os incrementos positivos ao enraizamento adventício das miniestacas ocorreram até a maior concentração de AIB. Já o clone H20 apresentou comportamento quadrático com máxima eficiência técnica na concentração de  $5.633,8 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB.
- Os clones H19 e H20 apresentaram os maiores índices de enraizamento.

## REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. *et al.* **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 442 p.
- ALMEIDA, F. D. *et al.* Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 455-463, 2007.
- ASSIS, T. F. de; MAFIA, R. G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p. 93-121.
- BRONDANI, G. E. *et al.* Ambiente de enraizamento e substratos na miniestaquia de erva-mate. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 3, p. 257-267, 2007.
- COOPER, M. A.; GRAÇA, M. E. C. **Perspectivas para a maximização de enraizamento de estacas de *Eucalyptus dunnii* Maid**. Curitiba: EMBRAPA/CNPQ, 1987. 9 p. (Circular Técnica, 12).
- COOPER, M. A.; GRAÇA, M. E. C. **Enraizamento de estacas de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. Colombo: EMBRAPA/CNPQ, 1994. 15 p. (Circular Técnica, 22).
- CUNHA, A. C. M. C. M. da; WENDLING, I.; SOUZA JUNIOR, L. Produtividade e sobrevivência de minicepas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage em sistema de hidroponia e em tubete. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 3, p. 307-310, 2005.
- CUNHA, A. C. M. C. M. da **Relações do estado nutricional de minicepas e condições meteorológicas com o número e o enraizamento de miniestacas de eucalipto**. 99 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- ELDRIDGE, K. *et al.* Mass vegetative propagation. In: ELDRIDGE, K. *et al.* **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon Press, 1994. p. 228-246.
- EMBRAPA. Núcleo Tecnológico para Informática. **SOC – Software Científico**. Campinas, 1990.
- FERREIRA, E. M. *et al.* Determinação do tempo ótimo do enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 2, p. 183-187, 2004.
- GATTI, K. C. **Propagação vegetativa de pau mulato (*Calycophyllum spruceanum* (Benth) K. Schum.), jequitibá (*Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze) e teca (*Tectona grandis* Linn. F.) por miniestaquia**. 72 f. Tese (Mestrado em Ciência Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

GRAÇA, M. E. C.; SHIMIZU, J. Y.; TAVARES, F. R. Capacidade de rebrota e de enraizamento de *Eucalyptus benthamii*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 39, p. 135-138, 1999.

HARTMANN, H. T. *et al.* **Plant propagation: principles and practices**. 7<sup>th</sup> Edition, New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880 p.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. de A.; GONÇALVES, A. N. Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais - IPEF**, 2000. 11 p. (Circular Técnica IPEF, 192).

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. de A.; GONÇALVES, A. N. Nutrição e adubação em minijardim clonal hidropônico de *Eucalyptus*. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais - IPEF**, 2002. 21 p. (Circular Técnica IPEF, 194).

MAFIA, R. G. *et al.* Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 843-851, 2005.

MSTAT – **Statistics Program**. Michigan, USA: Crop and Soil Department Science – FREED, R. D., Director, Michigan State University, 1994.

ROSA, L. S. da **Adubação nitrogenada e substratos na miniestaquia de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SANTOS, A. P. dos *et al.* Efeito da estaquia, miniestaquia, microestaquia e micropropagação no desempenho silvicultural de clones de *Eucalyptus grandis*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 68, p. 29-38, 2005.

SOUZA JUNIOR, L.; WENDLING, I. Propagação vegetativa de *Eucalyptus dunnii* via miniestaquia de material juvenil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 46, p. 21-30, 2003.

STORCK, L. *et al.* **Experimentação vegetal**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2000. 198 p.

TITON, M. **Propagação clonal de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia e micropropagação**. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Dinâmica do enraizamento de microestacas de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 6, p. 665-673, 2002.

TITON, M. *et al.* Efeito do AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2003a.

TITON, M. *et al.* Eficiência das minicepas e microcepas na produção de propágulos de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 5, p. 619-625, 2003b.



TORRES, A. G. M. **Relação entre sazonalidade, desrama e carboidratos no crescimento do eucalipto na propagação vegetativa por miniestaquia**. 65 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Setor de Ciências Agrárias, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2003.

WENDLING, I. **Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia**. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

WENDLING, I. *et al.* Efeito do regulador de crescimento AIB na propagação de clones de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 24, n. 2, p. 187-192, 2000.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p. 187-194, 2001.

WENDLING, I. **Rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia seriada e micropropagação**. 95 f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

WENDLING, I.; FERRARI, M. P.; GROSSI, F. **Curso intensivo de viveiros e produção de mudas**. Colombo: Embrapa Florestas - CNPF, 2002. 48 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 79).

WENDLING, I.; XAVIER, A. Miniestaquia seriada no rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 4, p. 475-480, 2003.

WENDLING, I.; XAVIER, A.; PAIVA, H. N. Influência da miniestaquia seriada no vigor de minicepas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 5, p. 611-618, 2003.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência da miniestaquia seriada no vigor radicular de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 5, p. 681-689, 2005a.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência do ácido indolbutírico e da miniestaquia seriada no enraizamento e vigor de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 921-930, 2005b.

XAVIER, A.; WENDLING, I. **Miniestaquia na clonagem de *Eucalyptus***. Viçosa: SIF, 1998. 10 p. (Informativo Técnico SIF, 11).

ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; RODRIGUES, J. D. **Estaquia**: uma abordagem dos principais aspectos fisiológicos. Curitiba: UFPR, 2001a. 39 p.

ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; RODRIGUES, J. D. Relações entre época do ano e diferentes concentrações de ácido indol butírico no enraizamento de estacas de *Eucalyptus grandis*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 42, p. 71-80, 2001b.

## **ANEXOS**

**ANEXO 1** - Valores médios das temperaturas do ar de outubro de 2006 a setembro de 2007 na estufa de polietileno que continha o minijardim clonal de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*.

Semana	Temperatura				Temperatura			
	----- (°C ± σ) -----				----- (°C ± σ) -----			
	----- Outubro de 2006 -----				----- Abril de 2007 -----			
	Coleta	Tmáx	Tméd	Tmín	Coleta	Tmáx	Tméd	Tmín
1	1º	29,6 ± 4,2	21,9 ± 2,3	14,3 ± 0,8		29,3 ± 4,3	22,6 ± 2,8	16,0 ± 1,8
2	2º	29,1 ± 4,1	21,8 ± 1,8	14,4 ± 1,0	18º	27,9 ± 2,2	20,9 ± 1,1	13,9 ± 2,0
3	3º	27,6 ± 8,0	20,3 ± 4,0	13,0 ± 2,2		29,0 ± 1,6	21,9 ± 1,0	14,9 ± 1,2
4	4º	32,8 ± 4,3	23,0 ± 3,2	13,2 ± 2,3	19º	28,1 ± 5,2	20,7 ± 3,0	13,2 ± 3,3
Semana	----- Novembro de 2006 -----				----- Maio de 2007 -----			
1		30,7 ± 4,3	23,2 ± 2,0	15,7 ± 1,7		31,6 ± 2,4	22,9 ± 1,3	14,1 ± 2,3
2	5º	29,4 ± 2,7	20,7 ± 1,5	12,0 ± 1,2		27,9 ± 2,7	18,9 ± 2,5	10,0 ± 4,4
3	6º	31,3 ± 6,6	22,9 ± 3,5	14,6 ± 1,3	20º	26,3 ± 4,8	20,6 ± 2,4	15,0 ± 1,2
4	7º	32,1 ± 3,8	24,2 ± 1,7	16,2 ± 1,2		28,3 ± 3,7	18,1 ± 2,8	7,9 ± 4,9
Semana	----- Dezembro de 2006 -----				----- Junho de 2007 -----			
1	8º	33,6 ± 5,8	24,7 ± 3,1	15,9 ± 1,2		28,0 ± 3,8	16,6 ± 2,2	5,1 ± 4,6
2		29,6 ± 3,2	22,2 ± 1,7	14,9 ± 0,7	21º	32,3 ± 1,7	19,9 ± 1,6	7,4 ± 2,8
3	9º	34,7 ± 2,5	26,8 ± 2,3	18,9 ± 3,8		31,4 ± 2,0	20,9 ± 1,9	10,3 ± 3,3
4	10º	33,7 ± 4,2	25,3 ± 2,5	16,9 ± 1,9	22º	27,9 ± 4,7	18,7 ± 2,3	9,4 ± 1,9
Semana	----- Janeiro de 2007 -----				----- Julho de 2007 -----			
1	11º	29,3 ± 2,4	23,5 ± 1,4	17,7 ± 1,0	23º	31,4 ± 1,1	18,8 ± 1,2	6,1 ± 2,1
2		35,0 ± 4,7	25,5 ± 2,7	16,0 ± 1,0		27,7 ± 6,5	18,9 ± 4,1	10,1 ± 2,1
3	12º	33,4 ± 6,6	24,9 ± 3,7	16,3 ± 1,7		25,0 ± 5,5	15,9 ± 2,3	6,9 ± 4,9
4	13º	33,1 ± 5,6	24,9 ± 3,0	16,7 ± 2,5	24º	27,3 ± 1,6	16,0 ± 2,6	4,6 ± 5,4
Semana	----- Fevereiro de 2007 -----				----- Agosto de 2007 -----			
1		34,6 ± 4,5	25,3 ± 2,6	16,0 ± 2,6		30,6 ± 3,0	20,0 ± 1,6	9,4 ± 2,6
2	14º	30,1 ± 5,0	23,0 ± 2,1	15,9 ± 2,1		27,9 ± 4,0	18,8 ± 3,0	9,7 ± 2,1
3		32,1 ± 5,0	24,1 ± 2,1	16,0 ± 2,2	25º	32,4 ± 2,1	20,9 ± 1,0	9,3 ± 2,1
4	15º	36,4 ± 5,0	27,1 ± 3,1	17,7 ± 1,4		28,1 ± 6,0	19,2 ± 3,4	10,2 ± 4,0
Semana	----- Março de 2007 -----				----- Setembro de 2007 -----			
1		36,3 ± 3,1	26,1 ± 1,6	16,0 ± 1,2	26º	36,0 ± 1,4	24,4 ± 0,8	12,7 ± 1,7
2	16º	32,4 ± 2,6	24,4 ± 1,3	16,3 ± 1,0		34,9 ± 2,0	23,3 ± 1,4	11,7 ± 2,9
3		29,4 ± 4,6	22,1 ± 2,3	14,7 ± 2,3	27º	34,3 ± 5,5	24,5 ± 2,9	14,7 ± 1,5
4	17º	34,4 ± 3,0	25,2 ± 2,0	16,1 ± 1,4		28,7 ± 5,2	20,3 ± 4,3	12,0 ± 4,3

Tmáx - média das temperaturas máximas, Tméd - média das temperaturas médias, Tmín - média das temperaturas mínimas.

σ - desvio padrão em relação ao valor médio.

Período considerado das estações do ano: primavera (22 de setembro a 21 de dezembro), verão (22 de dezembro a 21 de março), outono (22 de março a 21 de junho) e inverno (22 de junho a 21 de setembro).

**ANEXO 2** - Valores médios das temperaturas do ar de outubro de 2006 a setembro de 2007 na casa de vegetação automatizada para o enraizamento das miniestacas de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*.

Semana	Temperatura				Temperatura			
	----- (°C ± σ) -----				----- (°C ± σ) -----			
	----- Outubro de 2006 -----				----- Abril de 2007 -----			
	Coleta	Tmáx	Tméd	Tmín	Coleta	Tmáx	Tméd	Tmín
1	1º	29,4 ± 3,8	22,4 ± 1,8	15,4 ± 0,5		28,5 ± 1,9	23,6 ± 1,5	18,3 ± 1,5
2	2º	30,4 ± 2,8	23,1 ± 1,6	15,9 ± 1,5	18º	28,4 ± 1,1	22,4 ± 0,7	16,4 ± 1,3
3	3º	27,3 ± 3,4	21,4 ± 1,8	15,4 ± 0,8		(nc)	(nc)	(nc)
4	4º	30,8 ± 0,6	23,1 ± 0,5	15,4 ± 0,7	19º	(nc)	(nc)	(nc)
Semana	----- Novembro de 2006 -----				----- Maio de 2007 -----			
1		30,6 ± 1,5	23,9 ± 1,1	17,3 ± 1,4		(nc)	(nc)	(nc)
2	5º	30,1 ± 1,1	22,6 ± 0,6	15,1 ± 0,4		28,4 ± 1,4	20,6 ± 1,4	12,7 ± 3,0
3	6º	29,3 ± 2,9	23,0 ± 1,6	16,7 ± 1,4	20º	26,4 ± 4,6	20,5 ± 2,2	14,6 ± 1,0
4	7º	30,3 ± 0,5	24,1 ± 0,5	18,0 ± 1,0		28,1 ± 2,0	20,5 ± 1,0	12,8 ± 1,4
Semana	----- Dezembro de 2006 -----				----- Junho de 2007 -----			
1	8º	30,6 ± 1,0	23,9 ± 1,1	17,3 ± 1,7		29,4 ± 1,3	20,7 ± 0,8	12,0 ± 1,3
2		29,7 ± 0,8	23,0 ± 0,8	16,3 ± 1,0	21º	30,3 ± 1,2	21,4 ± 1,1	12,6 ± 1,1
3	9º	32,1 ± 1,3	25,8 ± 0,8	19,4 ± 0,5		29,9 ± 0,7	21,2 ± 1,1	12,6 ± 2,5
4	10º	31,1 ± 1,4	24,8 ± 1,2	18,5 ± 1,6	22º	28,4 ± 3,2	19,8 ± 1,7	11,2 ± 1,5
Semana	----- Janeiro de 2007 -----				----- Julho de 2007 -----			
1	11º	30,3 ± 0,8	24,8 ± 0,7	19,3 ± 0,8	23º	30,0 ± 1,0	20,2 ± 1,9	10,4 ± 3,6
2		31,4 ± 1,6	24,5 ± 1,1	17,6 ± 1,3		26,9 ± 5,3	20,0 ± 3,6	13,1 ± 2,3
3	12º	31,6 ± 1,3	24,8 ± 0,9	18,0 ± 1,3		26,4 ± 4,9	20,4 ± 2,2	14,3 ± 1,3
4	13º	31,1 ± 1,0	24,6 ± 1,1	18,1 ± 1,9	24º	28,2 ± 1,7	20,7 ± 2,3	13,1 ± 3,8
Semana	----- Fevereiro de 2007 -----				----- Agosto de 2007 -----			
1		30,7 ± 0,8	24,2 ± 0,6	17,7 ± 1,4		29,1 ± 1,2	22,4 ± 1,3	15,6 ± 1,8
2	14º	29,3 ± 1,4	23,5 ± 0,6	17,7 ± 1,6		28,1 ± 2,6	20,6 ± 3,8	13,0 ± 5,2
3		30,3 ± 0,8	24,1 ± 1,0	17,9 ± 2,0	25º	29,7 ± 0,5	21,1 ± 0,6	12,6 ± 1,5
4	15º	31,3 ± 1,7	25,1 ± 0,9	19,0 ± 0,8		27,0 ± 3,6	20,0 ± 2,5	12,9 ± 4,1
Semana	----- Março de 2007 -----				----- Setembro de 2007 -----			
1		30,9 ± 0,4	24,5 ± 0,4	18,1 ± 1,0	26º	30,0 ± 1,2	22,6 ± 1,4	15,1 ± 2,2
2	16º	30,9 ± 1,8	24,5 ± 1,0	18,1 ± 1,2		29,3 ± 0,5	23,2 ± 1,4	17,1 ± 3,0
3		30,9 ± 0,4	23,8 ± 0,8	16,7 ± 1,7	27º	27,7 ± 1,3	24,8 ± 2,2	21,9 ± 3,6
4	17º	30,5 ± 0,7	24,5 ± 0,7	18,4 ± 1,1		25,7 ± 2,7	22,1 ± 3,1	18,4 ± 3,9

Tmáx - média das temperaturas máximas, Tméd - média das temperaturas médias, Tmín - média das temperaturas mínimas.

σ - desvio padrão em relação ao valor médio.

(nc) dados não coletados em função da manutenção e limpeza da casa de vegetação.

Período considerado das estações do ano: primavera (22 de setembro a 21 de dezembro), verão (22 de dezembro a 21 de março), outono (22 de março a 21 de junho) e inverno (22 de junho a 21 de setembro).

**ANEXO 3** - Matriz de Correlação de Pearson entre a sobrevivência de minicepas (SM), produção de miniestacas por minicepa (PMM), produção de miniestacas por metro quadrado (PMQ), médias das temperaturas máximas (Tmáx), temperaturas médias (Tméd) e temperaturas mínimas (Tmín) registradas na estufa de polietileno que continha o minijardim clonal de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, ao longo de 352 dias de coletas sucessivas de brotações.

Característica	SM	PMM	PMQ	Tmáx	Tméd	Tmín
<b>SM</b>	1,000					
<b>PMM</b>	-0,022 <sup>ns</sup>	1,000				
<b>PMQ</b>	-0,022 <sup>ns</sup>	1,000**	1,000			
<b>Tmáx</b>	-0,057 <sup>ns</sup>	0,378**	0,378**	1,000		
<b>Tméd</b>	-0,014 <sup>ns</sup>	0,481**	0,481**	0,835**	1,000	
<b>Tmín</b>	0,023 <sup>ns</sup>	0,451**	0,451**	0,510**	0,899**	1,000

<sup>ns</sup> não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

**ANEXO 4** - Matriz de Correlação de Pearson entre sobrevivência de miniestacas durante saída da casa de vegetação (SSCV), saída da casa de sombra (SSCS), sobrevivência em área de pleno sol (SAPS), médias das temperaturas máximas (Tmáx), temperaturas médias (Tméd) e temperaturas mínimas (Tmín) registradas na casa de vegetação automatizada, ao longo de 352 dias de coletas sucessivas de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*.

Característica	SSCV	SSCS	SAPS	Tmáx	Tméd	Tmín
<b>SSCV</b>	1,000					
<b>SSCS</b>	0,734**	1,000				
<b>SAPS</b>	0,716**	0,956**	1,000			
<b>Tmáx</b>	-0,639**	-0,688**	-0,665**	1,000		
<b>Tméd</b>	-0,582**	-0,655**	-0,735**	0,757**	1,000	
<b>Tmín</b>	-0,441**	-0,514**	-0,632**	0,485**	0,939**	1,000

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

**ANEXO 5** - Resumo da análise de variância com decomposição dos tratamentos em regressão polinomial, para as características da sobrevivência na saída da casa de vegetação (SSCV), saída da casa de sombra (SSCS), número de brotações por muda (NB) e comprimento médio de brotações por muda (CMB) de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnei*, em função dos tratamentos de AIB.

Causas da Variação	GL	Soma de Quadrados			
		SSCV	SSCS	NB <sup>(1)</sup>	CMB <sup>(1)</sup>
		----- (%) -----	-----	(muda <sup>-1</sup> )	(cm muda <sup>-1</sup> )
AIB	4	691,27	4.026,47	0,0335	0,0109
1º grau	1	491,23*	3.678,25**	0,0070 <sup>ns</sup>	0,0053 <sup>ns</sup>
2º grau	1	0,97 <sup>ns</sup>	248,74 <sup>ns</sup>	0,0073 <sup>ns</sup>	0,0012 <sup>ns</sup>
3º grau	1	87,10 <sup>ns</sup>	21,76 <sup>ns</sup>	0,0166 <sup>ns</sup>	0,0003 <sup>ns</sup>
Resíduo	70	5.878,20	19.780,14	0,3797	0,3435
Média	-	94,09	41,90	1,45	1,56
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	9,74	40,11	19,90	18,01
SQM	-	491,23	3.678,25	-	-
SQT	-	691,27	4.026,47	-	-
R <sup>2</sup>	-	0,71	0,91	-	-

<sup>ns</sup> não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

\* e \*\* significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente, pelo teste F.

<sup>(1)</sup> dados transformados por  $\sqrt{\frac{n}{10}}$  ao nível de 5% de probabilidade de erro.

GL = graus de liberdade, CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental, SQM = soma de quadrados do modelo, SQT = soma de quadrados do tratamento, R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação.

**ANEXO 6** - Resumo da análise de variância com decomposição dos tratamentos em regressão polinomial, para a característica da sobrevivência em área de pleno sol (SAPS) de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnei*, em função dos diferentes clones (H12, H19 e H20) e concentrações de AIB.

Causas da Variação	GL	Soma de Quadrados		
		H12	H19	H20
		----- (%) -----		
AIB	4	1.354,74	930,32	2.530,30
1º grau	1	1.044,61**	689,54*	1.044,79*
2º grau	1	46,64 <sup>ns</sup>	72,91 <sup>ns</sup>	605,12*
3º grau	1	261,15*	1.46,92 <sup>ns</sup>	199,88 <sup>ns</sup>
Resíduo	20	1.142,51	1.877,31	2.775,35
Média	-	21,14	48,00	34,27
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	35,74	20,18	34,36
SQM	-	1.044,61	689,54	1.649,91
SQT	-	1.354,74	930,32	2.530,30
R <sup>2</sup>	-	0,77	0,74	0,65

<sup>ns</sup> não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

\* e \*\* significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente, pelo teste F.

GL = graus de liberdade, CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental, SQM = soma de quadrados do modelo, SQT = soma de quadrados do tratamento, R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação.

## CAPÍTULO II

### MICROPROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden

#### RESUMO

O trabalho teve como objetivo avaliar a técnica de micropropagação como método de clonagem de híbridos de *E. benthamii* x *E. dunnii*, visando: (i) determinar a melhor concentração de cloro ativo (NaOCl) para assepsia de segmentos nodais, (ii) verificar a melhor relação entre benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA) para a proliferação de gemas, (iii) verificar a melhor relação entre BAP e ácido giberélico ( $GA_3$ ) e meio de cultura para o alongamento de brotações. As minicepas fornecedoras de propágulos para introdução *in vitro* foram conduzidas em minijardim clonal sob sistema semi-hidropônico. Segmentos nodais dos clones H12, H19 e H20 foram desinfestados com 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% (v/v) de cloro ativo (NaOCl) durante 10 minutos e inoculados em meio de cultura MS. Para a proliferação de gemas, utilizou-se o meio de cultura  $\frac{1}{2}$ MS suplementado com as combinações de 0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mg L<sup>-1</sup> de BAP com 0; 0,025; 0,050; 0,075 e 0,100 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Para o alongamento das brotações, testaram-se os meios de cultura MS e  $\frac{1}{2}$ MS, ambos suplementados com as concentrações de 0; 0,05 e 0,10 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0; 0,1; 0,2 e 0,3 mg L<sup>-1</sup> de  $GA_3$ . Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. Os clones estudados não apresentaram diferenças significativas em relação às concentrações de NaOCl. A porcentagem de estabelecimento foi satisfatória e apresentou valores acima de 45%, contudo a contaminação fúngica foi a principal responsável pela perda de material. O clone H19 apresentou elevada recalcitrância ao cultivo *in vitro*. A combinação de 0,50 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ANA proporcionou o melhor resultado quanto a proliferação de gemas para os clones H12 e H20. A concentração de 0,10 mg L<sup>-1</sup> de  $GA_3$  para o clone H12 e a de 0,20 mg L<sup>-1</sup> de  $GA_3$  para o clone H20, ambas combinadas com 0,10 mg L<sup>-1</sup> de BAP em meio básico  $\frac{1}{2}$ MS, promoveram os melhores resultados quanto ao alongamento das brotações. O efeito do  $GA_3$  sobre o padrão de resposta para o tamanho das brotações dependeu da composição básica do meio de cultura, sendo que o  $\frac{1}{2}$ MS proporcionou as melhores respostas para as características analisadas.

**Palavras-chave:** Estabelecimento *in vitro*. Multiplicação. Alongamento. BAP. ANA.  $GA_3$ .



***Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden  
MICROPROPAGATION**

**ABSTRACT**

This study aimed to evaluate the micropropagation technique as cloning method for *E. benthamii* x *E. dunnii* hybrids regarding: (i) the determination of the best sodium hypochlorite (NaOCl) concentration for nodal segments asepsis, (ii) to verify the best ratio between benzylaminopurine (BAP) and naphthaleneacetic acid (NAA) for multiples buds induction, (iii) the best BAP, gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) ratio and culture medium for shoots elongation. The ministumps shoots suppliers for *in vitro* introduction were cultivated in clonal minigarden under semi-hydroponic system in a sand bed. Nodal segments of H12, H19 and H20 clones were disinfected by immersion in 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0% (v/v) active chlorine (NaOCl) solutions for 10 minutes. Then, they were inoculated in MS culture medium. To obtain multiple buds, the ½MS culture medium supplemented with the combinations: 0, 0.25, 0.50, 0.75 and 1.00 mg L<sup>-1</sup> BAP with 0, 0.025, 0.050, 0.075 and 0.100 mg L<sup>-1</sup> NAA was used. For shoots elongation, the MS and ½MS culture medium were tested, both supplemented with 0, 0.05 and 0.10 mg L<sup>-1</sup> BAP and 0, 0.1, 0.2 and 0.3 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>. All experiments were conducted under whole a randomized design. The studied clones did not show significant differences in relation to NaOCl concentrations. The establishment percentage was satisfactory and presented values over 45%; even though, the fungal contamination was the main responsible for explant lose. The H19 clone showed high recalcitrance to *in vitro* cultivation. The best results of buds proliferation for the H12 and H20 clones were observed in 0.50 mg L<sup>-1</sup> BAP and 0.05 mg L<sup>-1</sup> NAA combinations. The concentration of 0.10 and 0.20 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>, both combined with 0.10 mg L<sup>-1</sup> BAP in ½MS culture medium, promoted the best results for shoots elongation of the H12 and H20 clones, respectively. The effect of GA<sub>3</sub> on the standard response of shoots size depended on the culture medium basic composition, where ½MS promoted the best responses to the evaluated characteristics.

**Key words:** *In vitro* establishment. Multiplication. Elongation. BAP. NAA. GA<sub>3</sub>.

## 1 INTRODUÇÃO

Os progressos obtidos nas últimas décadas na área de biologia molecular e da genética têm permitido avanços consideráveis da biotecnologia. Dentre as várias técnicas biotecnológicas, a propagação de plantas *in vitro* tem atraído a atenção de pesquisadores desde o início do século XX (MERKLE; NAIRN, 2005; NEHRA *et al.*, 2005; XAVIER; OTONI; PENCHEL, 2007).

A micropropagação envolve a produção de plantas a partir de órgãos, tecidos ou células, os quais são cultivados assepticamente *in vitro* em meio nutritivo adequado sob rigoroso controle das condições ambientais e nutricionais (GEORGE, 1993). Sua aplicabilidade, como a da estaquia, está baseada na teoria da totipotência celular, a qual estabelece a qualquer parte do vegetal potencial para regenerar os órgãos que lhe faltam, desde que sejam fornecidas as condições adequadas (TORRES; CALDAS; FERREIRA, 1998).

Os trabalhos pioneiros em cultura de tecidos vegetais no Brasil foram desenvolvidos na década de 50 pelo Dr. Agesilau Bitancourt, do Instituto Biológico de São Paulo. Entre os anos de 1975 e 1980 foram criados os laboratórios da Universidade de Campinas, pertencente ao Instituto Agrônomo de Campinas e, da EMBRAPA, em vários de seus centros de pesquisas (TORRES; CALDAS; FERREIRA, 1998), diversificando essa técnica em muitas regiões brasileiras.

Atualmente, dentre as várias técnicas de propagação *in vitro*, a micropropagação é a técnica mais difundida e com aplicações comprovadas na área florestal (XAVIER; OTONI; PENCHEL, 2007), onde grande parte dos estudos para *Eucalyptus* tem sido direcionada para a otimização da clonagem de explantes oriundos de árvores adultas (DEL PONTE *et al.*, 2001).

Segundo Xavier e Comério (1997) e Joshi *et al.* (2003), essa técnica encontra-se embutida nos programas de melhoramento que, na maioria das vezes, objetivam a maximização ou manutenção do valor genético do clone a ser propagado, permitindo acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa.

Wendling, Ferrari e Grossi (2002) e Xavier, Otoni e Penchel (2007) ressaltam que a micropropagação a partir de segmentos de órgãos ou tecidos meristemáticos, com a indução direta de gemas (organogênese direta) ou estímulo de gemas pré-

existentes pela quebra de dominância apical, é a mais indicada, especialmente pelo fato de permitir menores variações genéticas em relação ao explante original.

A possibilidade de propagação massal de clones em um curto espaço de tempo, maior controle nutricional, ambiental e fitopatológico, transporte do material clonal por grandes distâncias sem danos, armazenamento por longos períodos e a retenção do vigor híbrido (GEORGE, 1993; BISHT *et al.*, 1999), apresentam-se como as principais vantagens da aplicação dessa técnica.

Além disso, os problemas de enraizamento de estacas, principalmente observados em árvores adultas devido a alta produção de inibidores ao enraizamento, metabólitos secundários e fenóis, podem ser minimizados ou até solucionados pelo emprego da micropropagação (JOSHI *et al.*, 2003).

Através de sucessivos subcultivos também é possível reverter a juvenilidade do tecido vegetal (XAVIER; COMÉRIO, 1996). Outras aplicações como a conservação de germoplasma *in vitro*, obtenção de sementes sintéticas, limpeza clonal, possibilidade de patenteamento (XAVIER; OTONI; PENCHEL, 2007) também merecem destaque.

Apesar da técnica de micropropagação ser considerada a aplicação mais concreta e de maior impacto da cultura de tecidos, ela ainda se encontra em fase de estudos básicos para a viabilização técnico-econômica em alguns de seus aspectos (XAVIER; COMÉRIO, 1996). Custos elevados, devido a gama de equipamentos e produtos utilizados, bem como, a necessidade de mão-de-obra especializada (HARTMANN *et al.*, 2002), a necessidade de desenvolvimento de novos protocolos para diferentes espécies ou grupos de clones, a recalcitrância e os riscos de contaminação acidental das culturas por microorganismos (XAVIER; OTONI; PENCHEL, 2007) despontam como os principais problemas a serem superados.

Segundo Murashige<sup>4</sup> (1974, *apud* George, 1993) a micropropagação pode ser dividida em três estágios: Estágio I, o qual trata da seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas; Estágio II, que está ligado a multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas em meio próprio para a multiplicação; Estágio III, envolve a transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplante das plantas obtidas para substrato ou solo.

---

<sup>4</sup> MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, p. 135-166, 1974.

Contudo, esse esquema não precisa ser necessariamente seguido, permitindo alterações conforme as peculiaridades de cada espécie. Por exemplo, um Estágio 0 algumas vezes é citado, o qual corresponde ao tratamento dado à planta-matriz, onde são retirados os explantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Uma série de fatores influi no sucesso ou não da micropropagação, como o estado fisiológico da planta-matriz; seleção, coleta e tipo de explante; a assepsia utilizada; meio de cultura e seus componentes (nutrientes, vitaminas, carboidratos, dentre outros); concentrações e tipos de fitorreguladores de crescimento; condições de incubação; fotoperíodo; luminosidade; temperatura e habilidade do operador (GEORGE, 1993; HARTMANN *et al.*, 2002).

Um problema freqüente encontrado durante o isolamento de explantes é a oxidação de compostos fenólicos que são liberados pelas células danificadas com o corte. A utilização de substâncias antioxidantes como o ácido ascórbico e o PVP (polivinilpirrolidone), assim como a incubação inicial no escuro e transferência freqüente dos explantes pela renovação do meio de cultura são medidas que reduzem a oxidação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Segundo Hartmann *et al.* (2002) os fitorreguladores mais utilizados para cultivo *in vitro* referem-se as auxinas e citocininas. As auxinas em conjunto com as citocininas estimulam a divisão celular, além de proporcionar maior controle morfogênico (GEORGE, 1993). As giberelinas podem ser utilizadas em situações específicas (HARTMANN *et al.*, 2002), principalmente para promover o alongamento de brotações (GEORGE, 1993).

Nas fases de multiplicação e alongamento, as concentrações de fitorreguladores de crescimento variam em função da espécie e do tipo de explante (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Para a estimulação de proliferação de gemas axilares o BAP tem sido o fitorregulador mais utilizado em meio de cultura para espécies de *Eucalyptus* (DEL PONTE *et al.*, 2001).

Diversos trabalhos sobre cultivo *in vitro* têm utilizado BAP, ANA e GA<sub>3</sub> nas fases de multiplicação e alongamento para espécies de *Eucalyptus*, nas suas mais variadas concentrações e relações, sendo o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) o mais freqüentemente utilizado (BENNETT *et al.*, 1994; LIMA; GONÇALVES, 1998; BARRUETO CID *et al.*, 1999; SHARMA; RAMAMURTHY, 2000; AREZKI *et al.*, 2001; DEL PONTE *et al.*, 2001; GRAÇA *et al.*, 2001; JOSHI *et al.*, 2003; BILLARD; LALLANA, 2005; BUNN, 2005; BUNN *et al.*, 2005; ANDRADE;

ALMEIDA; GONÇALVES, 2006; GLOCKE; COLLINS; SEDGLEY, 2006; GLOCKE *et al.*, 2006; HAJARI *et al.*, 2006).

Dentre as substâncias mais utilizadas para o processo de desinfestação dos explantes, destacam-se o etanol e os compostos a base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio (NaOCl). Alfenas *et al.* (2004) recomendam a concentração de 0,5% de cloro ativo durante 20 minutos para segmentos nodais mais lignificados e 0,3% de cloro ativo durante 2 minutos para segmentos nodais mais tenros.

Usualmente, algumas gotas de detergente são adicionadas às soluções a base de cloro para aumentar o contato dessas com os tecidos, sendo o Tween 20 o mais utilizado em concentrações que variam de 0,01 a 0,05% (v/v). O etanol geralmente é empregado a 70% a 80% (v/v), pois acima dessa concentração é menos eficiente, além de poder desidratar rapidamente os tecidos. Além da ação germicida, o etanol apresenta propriedades surfactantes e, se aplicado inicialmente, pode facilitar a ação dos demais produtos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Em vista da inexistência de protocolos referentes ao cultivo *in vitro* de *E. benthamii* x *E. dunnii*, o trabalho teve como objetivos: (i) determinar a melhor concentração de cloro ativo (NaOCl) para assepsia de segmentos nodais, (ii) verificar a melhor relação de benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA) para a proliferação de gemas e, (iii) verificar a melhor relação de BAP e giberelina (GA<sub>3</sub>) e meio de cultura para o alongamento de brotações.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 CARACTERIZAÇÃO GERAL DO EXPERIMENTO

O trabalho foi conduzido de janeiro a dezembro de 2007 no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e no Laboratório de Propagação de Plantas, ambos pertencentes a Embrapa Florestas - CNPF.

### 2.2 FONTE DE EXPLANTES

O material utilizado para a obtenção dos explantes foi proveniente de minicepas dos clones híbridos H12, H19 e H20 de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, obtidas pelo processo de estaquia convencional e conduzidas sob sistema semi-hidropônico do tipo canaletão em leito de areia. A obtenção dos clones, constituição do minijardim clonal, manejo e nutrição das minicepas encontram-se detalhados no Capítulo I.

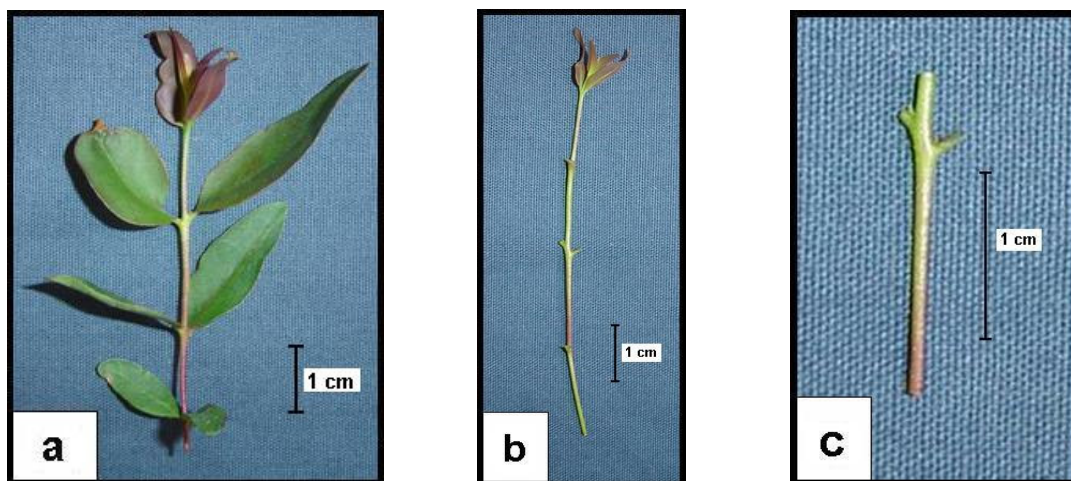
### 2.3 COLETA E PREPARO DOS EXPLANTES

Uma semana previamente a coleta das brotações foi aplicado fungicida Kumulus DF<sup>®</sup> (Enxofre como i.a.<sup>5</sup> modo de ação: contato) a 3 g L<sup>-1</sup> (p/v), conforme recomendações de Alfenas *et al.* (2004). As brotações utilizadas foram provenientes da 13<sup>ª</sup> coleta das minicepas (Figura 1a), sendo transportadas em sacos de polietileno contendo solução a 1% de ácido ascórbico (p/v).

Em laboratório, procedeu-se a remoção das folhas e a lavagem superficial do material vegetal com água deionizada (Figura 1b), visando a remoção de partículas e poeira. Durante todo o processo, os equipamentos utilizados foram esterilizados com solução a 70% de álcool (v/v).

---

<sup>5</sup> Ingrediente ativo.



**FIGURA 1** - (a): brotação logo após a coleta da minicepa de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, (b): detalhe da brotação após a remoção das folhas e lavagem superficial e, (c): explante após o preparo e padronização. Foto: Brondani (2007).

## 2.4 ESTABELECIMENTO

Como explantes, utilizaram-se segmentos nodais da porção mediana da brotação, contendo um par de gemas axilares, com a remoção das folhas e com tamanho médio de aproximadamente 1,5 cm (Figura 1c). Os explantes assim padronizados foram imersos em solução a 70% de álcool (v/v) por 15 segundos, enxaguados com água deionizada e autoclavada e, submetidos às soluções de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% (v/v) de cloro ativo (NaOCl) acrescidas de Tween 20 (0,05% v/v) durante 10 minutos.

Ao final do tratamento, foram enxaguados com água deionizada e autoclavada por 3 vezes e inoculados verticalmente em recipientes de vidro com 7 cm x 3 cm, contendo 10 ml do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). O meio de cultura foi suplementado com 250 mg L<sup>-1</sup> de PVP-40, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e o pH foi ajustado para 5,8. Após a inoculação, os explantes foram mantidos durante 7 dias no escuro, a fim de reduzir o processo oxidativo.

Avaliaram-se, semanalmente, a contaminação por fungos, bactérias, oxidação, sendo eliminados os explantes contaminados. Aos 21 dias realizou-se avaliação final, sendo considerado o número de explantes estabelecidos, e destes, mensurado o número de folhas, número de brotações e o comprimento total das brotações, a qual foi determinada com a utilização de uma régua graduada.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3x4), sendo os fatores constituídos por 3 clones (H12, H19 e H20) e 4 assepsias (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% de cloro ativo), com 5 repetições compostas de 5 explantes.

## 2.5 MULTIPLICAÇÃO

Utilizaram-se brotações dos clones H12 e H20 do híbrido *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* oriundas da fase de estabelecimento e subcultivadas 4 vezes até a obtenção de material suficiente para a instalação do experimento. Para tanto, estas foram cultivadas em tubos de ensaio de 10 cm x 2 cm, contendo 10 ml do meio de cultura  $\frac{1}{2}$ MS. Ao meio de cultura foram adicionados 0,25 mg L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP), 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenoacético (ANA), 250 mg L<sup>-1</sup> de PVP-40, 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e o pH foi ajustado para 5,8. Cada subcultivo teve um período de 21 dias.

Após os subcultivos iniciais, explantes contendo de 3 a 5 gemas foram inoculados em tubos de ensaio de 10 cm x 2 cm, com 10 ml do meio de cultura  $\frac{1}{2}$ MS suplementado com 0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP) e 0; 0,025; 0,050; 0,075 e 0,100 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenoacético (ANA). Ao meio de cultura adicionou-se, ainda, 250 mg L<sup>-1</sup> de PVP-40, 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e o pH foi ajustado para 5,8.

Aos 30 dias procedeu-se o subcultivo dos explantes para novo meio de cultura. O número de gemas formadas por explante foi avaliado aos 60 dias após a inoculação.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (2x5x5), testando-se 2 clones (H12 e H20), 5 concentrações de BAP combinadas com 5 concentrações de ANA. Para tanto, utilizou-se 5 repetições compostas de 1 explante.



## 2.6 ALONGAMENTO

Explantos contendo de 15 a 20 gemas, obtidos na fase de multiplicação dos clones H12 e H20, foram cultivados em frascos de 7 cm x 6 cm durante 21 dias em 30 ml do meio de cultura  $\frac{1}{2}$ MS suplementado com 250 mg L<sup>-1</sup> de PVP-40, 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e o pH foi ajustado para 5,8. Esse procedimento visou eliminar algum efeito residual dos tratamentos utilizados na fase de multiplicação.

Após essa etapa, os explantes foram inoculados em frascos de 7 cm x 6 cm com 30 ml do meio de cultura MS contendo 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e  $\frac{1}{2}$ MS contendo 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, ambos suplementados com 0; 0,05 e 0,10 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0; 0,1; 0,2 e 0,3 mg L<sup>-1</sup> de giberelina (GA<sub>3</sub>). Adicionou-se ao meio de cultura 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 250 mg L<sup>-1</sup> de PVP-40, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e o pH foi ajustado para 5,8.

O número de brotações alongadas e o comprimento médio das brotações por explante foram avaliados aos 30 dias após a inoculação.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (2x2x3x4), testando-se 2 clones (H12 e H20), 2 meios de cultura (MS e  $\frac{1}{2}$ MS), 3 concentrações de BAP combinadas com 4 concentrações de GA<sub>3</sub>. Para tanto, utilizou-se 5 repetições compostas de 1 explante.

## 2.7 PREPARO DO MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES AMBIENTAIS

A cada preparo do meio de cultura com água deionizada, o valor do pH foi ajustando com HCl (0,1M) e NaOH (0,1M), previamente a adição do ágar ao meio nutritivo, e então autoclavado a temperatura de 121 °C ( $\approx 1,0 \text{ kgf cm}^{-2}$ ) durante 20 minutos. Em todos os experimentos realizados, os explantes foram cultivados em sala de incubação com temperatura mantida a 25 °C ( $\pm 2 \text{ °C}$ ), fotoperíodo de 16 horas luz e luminosidade em torno de 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , fornecidas por lâmpadas fluorescentes do tipo branca-frias.

Os fitorreguladores de crescimento BAP e ANA foram adicionados ao meio de cultura antes da autoclavagem. O GA<sub>3</sub> foi adicionado ao meio de cultura, ainda em fase líquida, logo após a autoclavagem. O procedimento foi executado em câmara de fluxo laminar por meio da utilização de filtro descartável Millex - GP® com membrana estéril de 0,22  $\mu\text{m}$ .

## 2.8 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

Todos os experimentos foram repetidos em duplicata, sendo utilizadas as médias de cada repetição para as análises estatísticas.

Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de Lilliefors ( $p < 0,05$ ), a fim de verificar a condição de normalidade da distribuição dos dados e, em seguida, procedeu-se a análise de variância (ANOVA) ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ).

Os dados qualitativos foram comparados pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) e os quantitativos analisados por regressão polinomial ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ).

Utilizaram-se os pacotes estatísticos MSTAT (STATISTICAL PROGRAM, 1994) e SOC (EMBRAPA, 1990) para a realização dos procedimentos estatísticos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 ESTABELECIMENTO

Com base nos resultados da análise de variância para as características amostradas, verificou-se que não existiu interação entre o efeito do clone em relação as concentrações de cloro ativo testadas, ou seja, os clones H12, H19 e H20 responderam semelhantemente quanto ao tratamento asséptico. No entanto, existiu efeito significativo entre os clones quanto à porcentagem de contaminação bacteriana ( $p<0,01$ ), oxidação ( $p<0,05$ ) e explantes estabelecidos ( $p<0,01$ ), aos 21 dias após ser efetuada a inoculação (Tabela 1).

Quanto a análise de regressão polinomial para as características amostradas em função das concentrações de cloro ativo, não foi observado efeito significativo (Tabela 1), bem como, não existiu ajuste entre os modelos testados (Anexo 1).

**TABELA 1** - Resumo da análise de variância para as características da contaminação fúngica (F), contaminação bacteriana (B), explantes oxidados (O), explantes estabelecidos (E), número de folhas (NF), comprimento médio de broto (CMB) e número de brotações (NB) de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*.

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios						
		F <sup>(1)</sup>	B <sup>(1)</sup>	O <sup>(1)</sup>	E <sup>(1)</sup>	NF	CMB	NB
		----- (%) -----				(expl. <sup>-1</sup> )	(cm expl. <sup>-1</sup> )	(expl. <sup>-1</sup> )
Clone (CL)	2	0,416 <sup>ns</sup>	0,303**	0,121*	0,605**	0,317 <sup>ns</sup>	0,057 <sup>ns</sup>	0,200 <sup>ns</sup>
Cloro (CLR)	3	0,151 <sup>ns</sup>	0,016 <sup>ns</sup>	0,028 <sup>ns</sup>	0,172 <sup>ns</sup>	1,661 <sup>ns</sup>	0,027 <sup>ns</sup>	0,150 <sup>ns</sup>
CL x CLR	6	0,078 <sup>ns</sup>	0,019 <sup>ns</sup>	0,050 <sup>ns</sup>	0,104 <sup>ns</sup>	0,828 <sup>ns</sup>	0,041 <sup>ns</sup>	0,067 <sup>ns</sup>
Resíduo	48	0,144	0,035	0,024	0,106	1,05	0,030	0,208
Média	-	41,33	3,33	3,00	52,33	5,48	0,74	1,75
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	24,42	23,92	19,97	18,81	18,69	23,62	26,08

<sup>ns</sup> não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

\* e \*\* significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente, pelo teste F.

<sup>(1)</sup> dados transformados por  $\sqrt{n+0,5}$  ao nível de 5% de probabilidade de erro.

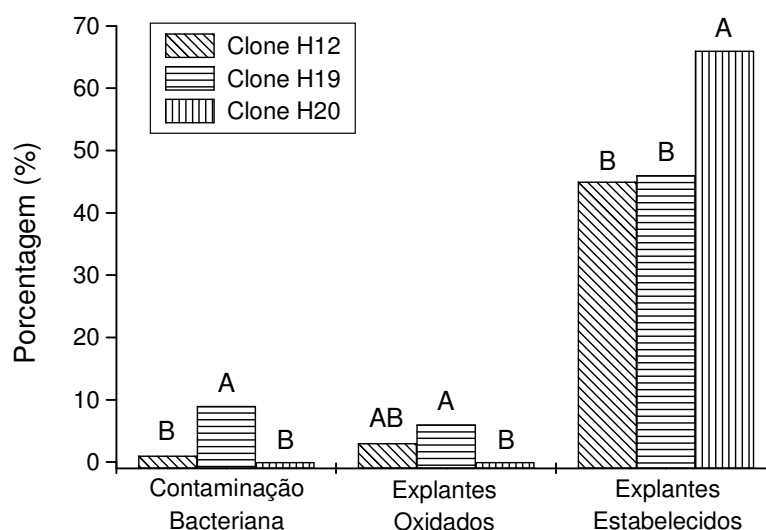
GL = grau de liberdade, CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental, expl. = explante.

A contaminação bacteriana dos segmentos nodais foi baixa. O clone H19 apresentou o maior valor médio com 9% de contaminação, diferindo significativamente do H12 e H20, os quais apresentaram valores de 1% e ausência de contaminação bacteriana, respectivamente (Figura 2).

Resultados semelhantes foram observados quanto ao percentual de explantes oxidados, os quais foram baixos após 21 dias da inoculação. O clone H20 não apresentou oxidação e diferiu significativamente do H19, o qual apresentou 6% de explantes oxidados. Já o clone H12 não diferiu significativamente dos demais, apresentando valor médio de 3% de oxidação (Figura 2).

Embora não tenha sido constatado efeito significativo entre os fatores testados quanto a porcentagem de contaminação fúngica (Tabela 1), essa ocorreu em maior proporção. Independente do clone avaliado, o valor médio foi estimado em 41,33% de contaminação, sendo responsável pela maior perda de material durante a fase de estabelecimento.

Aos 21 dias após a inoculação os clones H12 e H19 não diferiram quanto à porcentagem de explantes estabelecidos, ficando os valores médios de 45% e 46%, respectivamente. No entanto, o clone H20 apresentou o maior valor médio de explantes estabelecidos, com 66%, diferindo significativamente dos demais (Figura 2). Dos explantes estabelecidos, o número de folhas (NF), comprimento médio de brotos (CMB) e número de brotações (NB) não variaram significativamente entre os clones, estimando-se valores médios de 5,48, 0,74 cm e 1,75 para NF, CMB e NB, respectivamente (Tabela 1).



**FIGURA 2** - Valores médios da contaminação bacteriana, explantes oxidados e explantes estabelecidos de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni*, aos 21 dias após a inoculação. Médias seguidas por uma mesma letra dentro de cada característica avaliada não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Os protocolos de estabelecimento utilizando segmentos nodais para espécies de *Eucalyptus* são muito variáveis e muitas substâncias são utilizadas para a assepsia dos explantes. Agentes como o hipoclorito de sódio, comumente, apresentam resultados satisfatórios quanto ao estabelecimento de segmentos nodais (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998) e, além de ser mais facilmente comercializável (SOUZA; JUNGHANS, 2006), trazem menor risco a saúde.

Quando se utilizam materiais vegetativos diretamente do campo, os tratamentos desinfestantes são mais criteriosos, em virtude dos explantes apresentarem maiores níveis de contaminação. Nesses casos, geralmente as concentrações e tempos de exposições aos agentes de desinfestação são maiores, em comparação aos explantes provenientes de ambientes protegidos (ALFENAS *et al.*, 2004; SOUZA; JUNGHANS, 2006).

Tratamentos mais criteriosos podem ser observados nos trabalhos realizados por Watt *et al.* (2003) e Hajari *et al.* (2006), que estabeleceram brotações de clones de *Eucalyptus grandis* e *E. grandis* x *E. urophylla* ao submetê-las durante 2 minutos em 0,2 g L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> e, em seguida por 2 minutos em 10 g L<sup>-1</sup> de Ca(OCl)<sub>2</sub>. Sharma e Ramamurthy (2000) utilizaram 1 g L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> durante 10 minutos para assepsia de segmentos nodais de plantas-matrizes de *E. tereticornis* de 4 anos de idade. No entanto, o uso de cloreto de mercúrio não é muito recomendado, devido a sua ação altamente tóxica (GEORGE, 1993).

Quanto ao uso de hipoclorito de sódio, Joshi *et al.* (2003) ao trabalhar com segmentos nodais de 2 cm a 3 cm de comprimento, coletados a campo de árvores de *E. tereticornis* x *E. grandis* de 30 anos de idade, obtiveram 50% de segmentos nodais não contaminados, quando expostos durante 20 minutos na concentração de 30% (v/v) de NaOCl<sub>2</sub>. Fantini Junior e Graça (1990) ao inocular segmentos nodais de *E. saligna* obtidos de estacas enraizadas de 11 plantas-matrizes, definiram protocolo de estabelecimento ao expor os segmentos nodais em solução de NaOCl a 1% (v/v) durante 15 minutos.

Tratamento semelhante foi realizado por Bennett *et al.* (1994) que utilizaram hipoclorito de sódio a concentração de 1% (v/v) durante 20 minutos para assepsia de segmentos nodais de *E. globulus* de árvores de 4 a 5 anos de idade. Santos *et al.* (2004) utilizaram solução à 1% (v/v) de NaOCl acrescida com 2 gotas de Tween 20 por 15 minutos para assepsia de segmentos nodais de *E. urophylla*.

Grattapaglia e Machado (1998) ressaltam que o estado fisiológico da planta de onde são retirados os explantes apresenta grande influência no posterior comportamento das culturas. Esse fator pode ter influenciado na resposta dos clones quanto aos efeitos do hipoclorito, pois os explantes foram provenientes de minicepas cultivadas em minijardim clonal manejadas sob sistema semi-hidropônico, onde segundo Campinhos *et al.* (1999), as vantagens mais relevantes desse sistema estão ligadas ao controle mais efetivo de todo o processo, como o maior controle da irrigação, nutrição, tratos culturais, pragas e doenças.

Em termos gerais, o estabelecimento de segmentos nodais foi satisfatório, obtendo-se valores médios acima de 45%, tanto na menor quanto na maior concentração de NaOCl utilizada.

A contaminação bacteriana e a oxidação resultaram em pouca influência na fase de estabelecimento. Entretanto, a contaminação por fungo requer maior atenção. Nesse caso, tratamentos com maior tempo de exposição ao NaOCl e/ou aplicações mais frequentes de fungicidas nas plantas-matrizes, podem resultar em maior descontaminação fúngica.

### 3.2 MULTIPLICAÇÃO

De acordo com a análise de variância na fase de proliferação de gemas, pode-se verificar que existiu interação ( $p < 0,01$ ) entre os fatores testados (Tabela 2).

Com base nessa observação, procedeu-se análise de variância com decomposição dos tratamentos quantitativos em regressão polinomial para cada clone. Como resultado, foi verificado interação ( $p < 0,01$ ) entre as concentrações de BAP e ANA para os clones estudados (H12 e H20), com representação dos dados em superfície de resposta (Anexo 2).

Os valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foram de 0,77 e 0,75, respectivamente para o clone H12 e H20, o que denota confiabilidade da equação ajustada em relação aos valores reais (Figura 3).

**TABELA 2** - Resumo da análise de variância para as características do número médio de gemas por explante (NG) de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*.

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios
		NG (explante <sup>-1</sup> )
Clone (CL)	1	268,324**
BAP	4	463,430**
ANA	4	39,180**
CL x BAP	4	45,714**
CL x ANA	4	26,244**
BAP x ANA	16	41,410**
CL x BAP x ANA	16	61,159**
Resíduo	200	0,786
Média	-	7,22
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	12,28

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

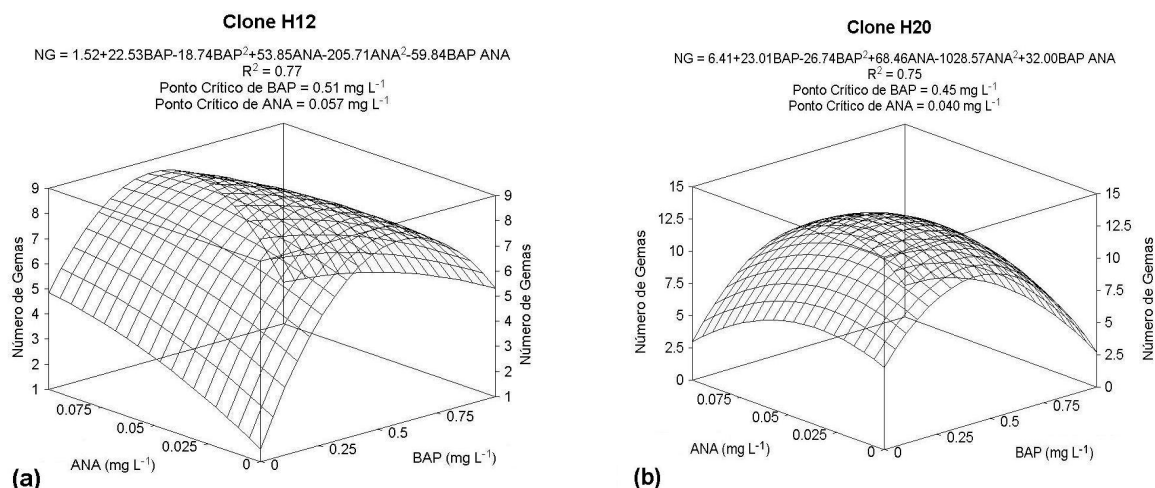
GL = graus de liberdade, CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental.

Embora o clone H19 tenha estabelecido satisfatoriamente, o mesmo mostrou-se altamente recalcitrante nas fases subseqüentes, apresentando elevados índices de oxidação durante a proliferação de gemas axilares, o que limitou o seu cultivo. Portanto, os dados referentes as fases de multiplicação e alongamento referem-se apenas aos resultados obtidos com os clones H12 e H20.

Pode-se observar que a presença de ANA promoveu resultados positivos quanto ao NG por explante ao interagir em determinadas concentrações com o BAP. Esse comportamento está de acordo com George (1993), segundo o qual o balanço entre citocininas e auxinas regula a fase de proliferação de gemas axilares (Figura 3). Contudo, os efeitos das concentrações dos fitorreguladores geralmente variam de acordo com o material genético (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O maior valor médio de gemas observado para o clone H12 ocorreu na estimativa das concentrações de 0,51 mg L<sup>-1</sup> de BAP combinado com 0,057 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Nessas concentrações de fitorreguladores, estimou-se valor médio de 8,8 gemas por explante (Figura 3a).

Em relação ao clone H20, as concentrações de 0,45 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,040 mg L<sup>-1</sup> de ANA corresponderam ao melhor resultado, com estimativa de 13,02 gemas por explante (Figura 3b) aos 60 dias após a inoculação.



**FIGURA 3** - Valores médios do número de gemas (NG) por explante de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* em função dos tratamentos de ANA e BAP, aos 60 dias após a inoculação. (a): clone H12 e (b): clone H20.

George (1993) e Grattapaglia e Machado (1998) salientam que o excesso de citocinina no meio de cultura pode causar toxidez ao explante, resultando em sérios problemas nas fases subseqüentes.

Bisht *et al.* (1999) verificaram para *E. tereticornis* x *E. camaldulensis*, que nas maiores concentrações de BAP (acima de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) ocorreram decréscimos do número de gemas proliferadas por explante, independente do clone testado. Fantini Junior e Graça (1990) e Dibax (2007) também observaram decréscimos da taxa de multiplicação de gemas para explantes de *E. saligna* a medida que a concentração de BAP aumentou.

Bennett *et al.* (1994) ao trabalhar com segmentos nodais de árvores *E. globulus* observaram decréscimos na média de gemas multiplicadas por explante nas concentrações de BAP acima de  $2,5 \text{ } \mu\text{mol}$  ( $\approx 0,56 \text{ mg L}^{-1}$ ) em meio MS, assemelhando-se com os resultados obtidos no presente estudo.

Esse efeito ocorreu a partir da concentração de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, onde existiu tendência de redução do número de gemas por explante (Figura 3). Em outras condições de trabalho, efeitos similares foram verificados por Brondani *et al.* (2007), que ao estudarem o mesmo híbrido, verificaram tendência de redução do NG a partir da concentração de  $2 \text{ } \mu\text{mol}$  de BAP ( $\approx 0,45 \text{ mg L}^{-1}$ ). Esse fato reforça que, dentro das condições experimentais, as concentrações acima de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP não são aconselhadas para a fase de multiplicação de gemas para o híbrido em estudo.



As respostas quanto as concentrações de fitorreguladores na micropropagação de *Eucalyptus* são muito variáveis e, dependem muito das condições de trabalho. Em estudo realizado por Gomes e Canhoto (2003) foi constatado que as concentrações de 0,9  $\mu\text{M}$  de BAP ( $\approx 0,20 \text{ mg L}^{-1}$ ) combinado com 0,05  $\mu\text{M}$  de ANA ( $\approx 0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ) em  $\frac{1}{2}\text{MS}$  foram as melhores para proliferação de gemas de *E. nitens*. Contudo, após 3 subcultivos (63 dias) obtiveram apenas 2,25 brotos por explante. Apesar do baixo índice de proliferação de gemas, os resultados foram promissores devido a alta recalcitrância apresentada pela espécie.

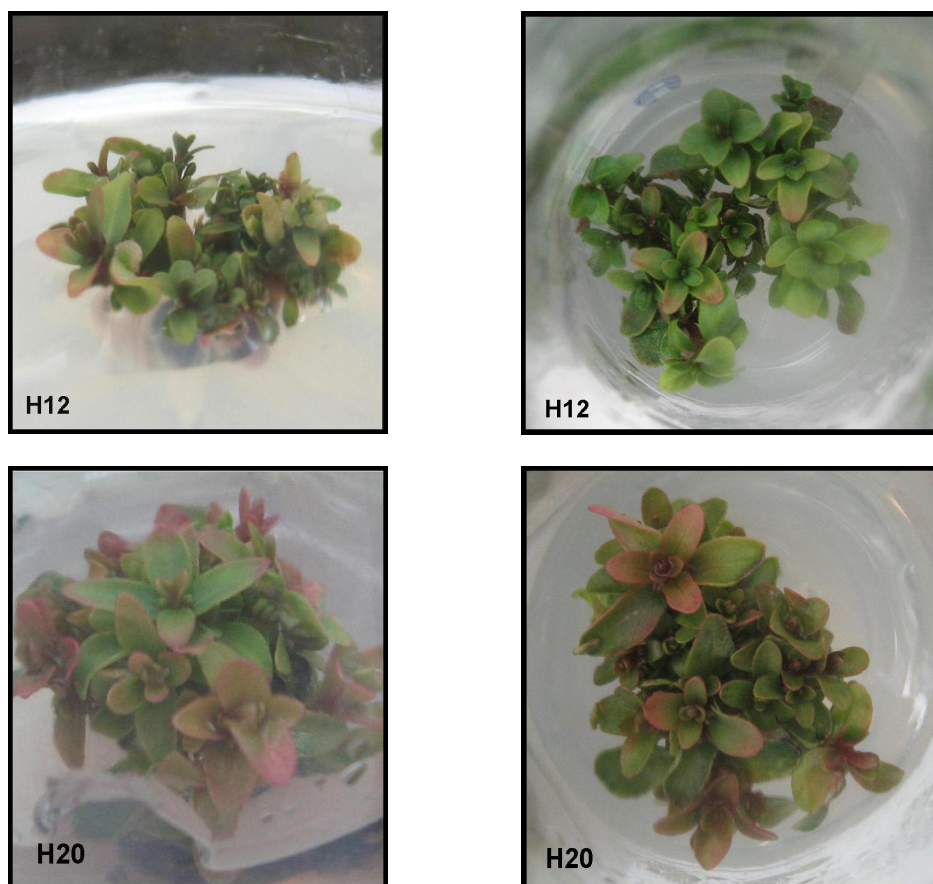
Joshi *et al.* (2003) obtiveram de 20 a 25 gemas por explante aos 150 dias em meio MS na concentração de 1  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP combinado com 1  $\text{mg L}^{-1}$  de ANA para *E. tereticornis* x *E. grandis*. Resultados semelhantes foram obtidos por Bisht *et al.* (1999) para *E. tereticornis* x *E. camaldulensis*, onde a maior taxa de multiplicação para todos os clones ocorreu nas combinações de 1  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP com 1  $\text{mg L}^{-1}$  de ANA, aos 120 dias de cultivo em meio MS.

Para *E. tereticornis*, Sharma e Ramamurthy (2000) obtiveram os melhores resultados de proliferação de gemas ao combinar as concentrações de 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP com 0,1  $\text{mg L}^{-1}$  de ANA em meio MS, obtendo de 20 a 30 gemas por explante.

As concentrações acima de 0,75  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP não resultaram em efeitos positivos quanto a proliferação de gemas, sendo que nas concentrações de 1  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP combinada com 0,1  $\text{mg L}^{-1}$  de ANA, além de ter resultado em sintomas de hiperhidricidade, foi constatado elevada oxidação e mortalidade de explantes. Segundo Grattapaglia e Machado (1998) e Alfenas *et al.* (2004), elevadas concentrações de BAP podem proporcionar elevado acúmulo desse fitorregulador nos tecidos e prejudicar o posterior desenvolvimento das brotações.

De maneira geral, em relação as características do NG, os clones H12 e H20 responderam de forma semelhante em relação as concentrações de fitorreguladores. Dentre as diferentes concentrações testadas, a combinação de 0,50  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP com 0,05  $\text{mg L}^{-1}$  de ANA foram as mais promissoras e próximas dos melhores valores estimados pelo modelo matemático, as quais resultaram no maior número de gemas por explante.

Ao final de 60 dias de cultivo em meio de cultura  $\frac{1}{2}\text{MS}$  suplementado com as melhores combinações de fitorreguladores, os explantes apresentaram boa aparência e vigor, não sendo observado sintoma de esgotamento ou toxidez nesse tratamento (Figura 4).



**FIGURA 4** - Aspecto visual da proliferação de gemas dos clones H12 e H20 de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, aos 60 dias após a inoculação em meio de cultura  $\frac{1}{2}$ MS nas concentrações de  $0,50 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA. Foto: Brondani (2007).

### 3.3 ALONGAMENTO

Houve interação ( $p < 0,01$ ) entre os fatores testados para as características do número de brotações alongadas por explante (NB) e comprimento médio de brotações (CMB) (Tabela 3).

Sendo assim, procedeu-se análise de variância com decomposição dos tratamentos quantitativos em regressão polinomial para cada clone e meio de cultura testados. Tanto o NB (Anexo 3) quanto o CMB (Anexo 4) apresentaram interação ( $p < 0,01$ ) entre as combinações de BAP e  $\text{GA}_3$  para cada clone (H12 e H20) e meio de cultura ( $\frac{1}{2}$ MS e MS) testados, com representação dos dados em superfície de resposta.

Os valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foram de 0,75 e 0,73, respectivamente para os clones H12 e H20 quando cultivados em  $\frac{1}{2}$ MS. Em meio de cultura MS os valores do  $R^2$  foram de 0,85 e 0,75, respectivamente para os clones H12 e H20. Esses fatos denotam confiabilidade das equações ajustadas em relação aos valores reais mensurados.

**TABELA 3** - Resumo da análise de variância para as características do número médio de brotações (NB) e comprimento médio de brotações (CMB) alongadas por explante de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*.

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios	
		NB (explante <sup>-1</sup> )	CMB <sup>(1)</sup> (cm explante <sup>-1</sup> )
Clone (CL)	1	44,08**	0,2795**
Meio (ME)	1	275,52**	1,2390**
BAP	2	188,16**	2,8623**
GA <sub>3</sub>	3	99,01**	0,8982**
CL x ME	1	21,33**	0,0039 <sup>ns</sup>
CL x BAP	2	25,01**	0,2320**
CL x GA <sub>3</sub>	3	32,35**	0,5374**
ME x BAP	2	33,19**	0,2597**
ME x GA <sub>3</sub>	3	45,62**	0,1368**
BAP x GA <sub>3</sub>	6	27,36**	0,0485**
CL x ME x BAP	2	13,22**	0,0372**
CL x ME x GA <sub>3</sub>	3	23,15**	0,0110*
CL x BAP x GA <sub>3</sub>	6	26,94**	0,0949**
ME x BAP x GA <sub>3</sub>	6	14,16**	0,0892**
CL x ME x BAP x GA <sub>3</sub>	6	18,38**	0,0132**
Resíduo	-	0,44	0,0038
Média	-	2,43	0,80
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	27,36	5,60

<sup>ns</sup> não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

\* e \*\* significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente, pelo teste F.

<sup>(1)</sup> dados transformados por  $\sqrt{n+0,5}$  ao nível de 5% de probabilidade de erro.

GL = grau de liberdade, CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental.

A presença de BAP ao meio de cultura suplementado com GA<sub>3</sub> favoreceu o alongamento das brotações. Ao ser cultivado em meio de cultura  $\frac{1}{2}$ MS, o clone H12 apresentou estimativa do maior número de brotações alongadas por explante (NB) nas concentrações de 0,11 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,13 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, às quais corresponderam a média de 10,6 brotações alongadas por explante (Figura 5a). Já o clone H20 apresentou os maiores resultados nas combinações de 0,08 mg L<sup>-1</sup> de

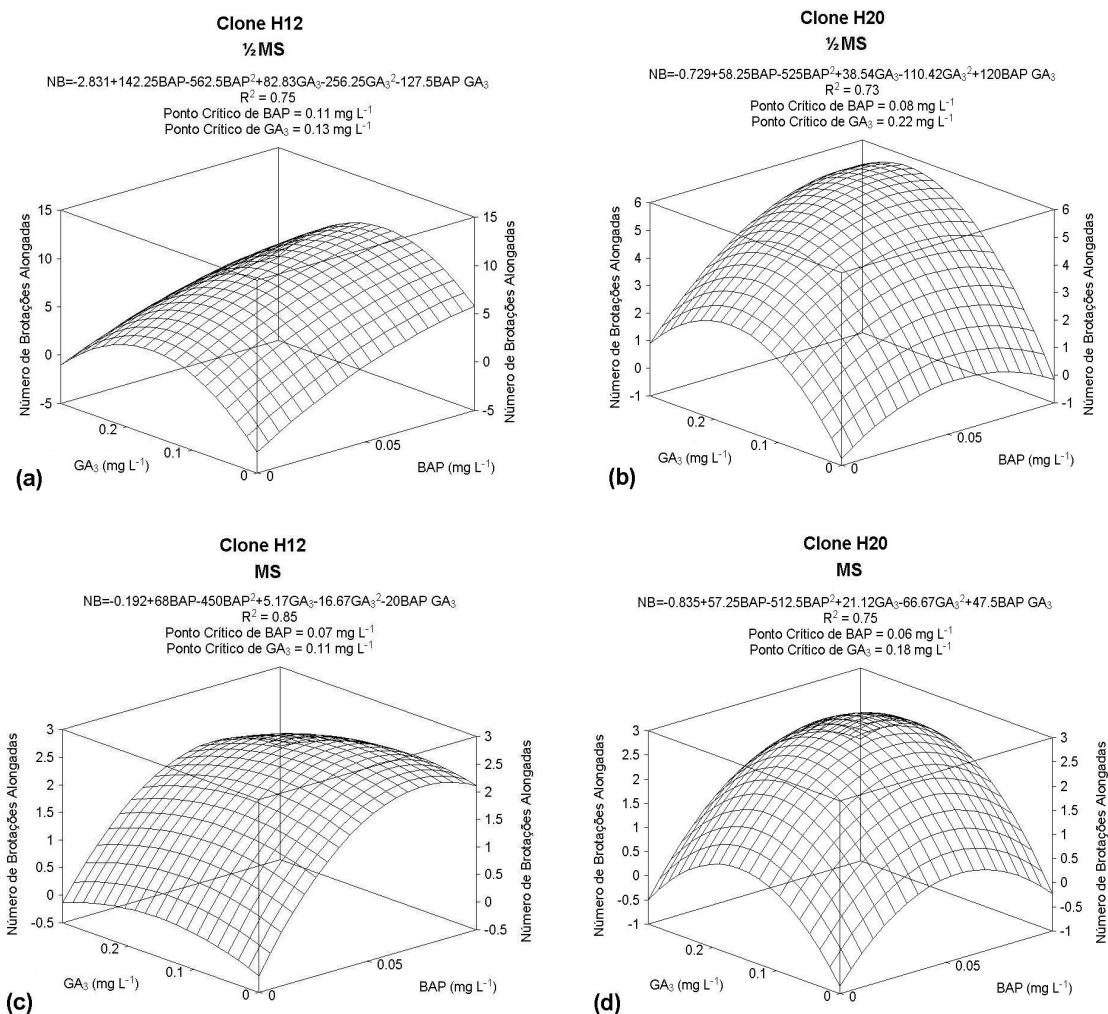
BAP com  $0,22 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$ , o que resultou numa estimativa de 5,82 brotos alongados por explante (Figura 5b).

Embora a estimativa do ponto crítico de BAP para o clone H12 tenha ficado, matematicamente, acima da maior concentração real utilizada no experimento (Figura 5a), pode-se perceber que a concentração de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP influenciou positivamente o NB, independente do clone estudado. No entanto, os clones apresentaram diferença de comportamento quanto ao fitorregulador  $\text{GA}_3$ . A concentração de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  foi a que favoreceu o maior NB para o clone H12, enquanto que a concentração de  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  proporcionou os melhores resultados para o clone H20. Além disso, o clone H12 apresentou, aproximadamente, o dobro do NB em comparação com o H20 quando cultivados em  $\frac{1}{2}\text{MS}$  (Figuras 5a e 5b).

Em meio de cultura MS, o clone H12 apresentou estimativa de 2,58 brotações alongadas por explante nas combinações de  $0,07 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,11 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  (Figura 5c). O clone H20, na estimativa das concentrações de  $0,06 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,18 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  apresentou 2,91 NB (Figura 5d).

Quando cultivados em meio de cultura MS, os clones apresentaram padrão de comportamento semelhante quanto ao NB, que ficou em torno de 3 brotações alongadas por explante, e ao ponto crítico de BAP, que foi em torno de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ . Entretanto, novamente apresentaram diferença quanto ao  $\text{GA}_3$ , ficando as concentrações de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$ , respectivamente, como as melhores para o H12 e H20.

Em termos comparativos de meio de cultura, existiu muita diferença do NB entre os clones. Verifica-se que o clone H12 ao ser cultivado em meio de cultura MS apresentou uma redução de aproximadamente 75% do número de brotações alongadas por explante, em comparação ao cultivo em  $\frac{1}{2}\text{MS}$ . Comportamento semelhante ocorreu com o clone H20, o qual apresentou uma redução de 50% do NB ao ser cultivado em MS, ao comparar com o maior valor obtido na composição do meio de cultura  $\frac{1}{2}\text{MS}$ . Além disso, os explantes cultivados em meio de cultura MS expressaram sintomas de oxidação, fato esse, que não ocorreu quando o meio de cultura foi reduzido a 50% da composição salina ( $\frac{1}{2}\text{MS}$ ).



**FIGURA 5** - Valores médios do número de brotações alongadas (NB) por explante de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* em função dos tratamentos de  $GA_3$  e BAP, aos 30 dias após a inoculação. (a): clone H12 e (b): clone H20 em meio ½MS, (c): clone H12 e (d): clone H20 em meio MS.

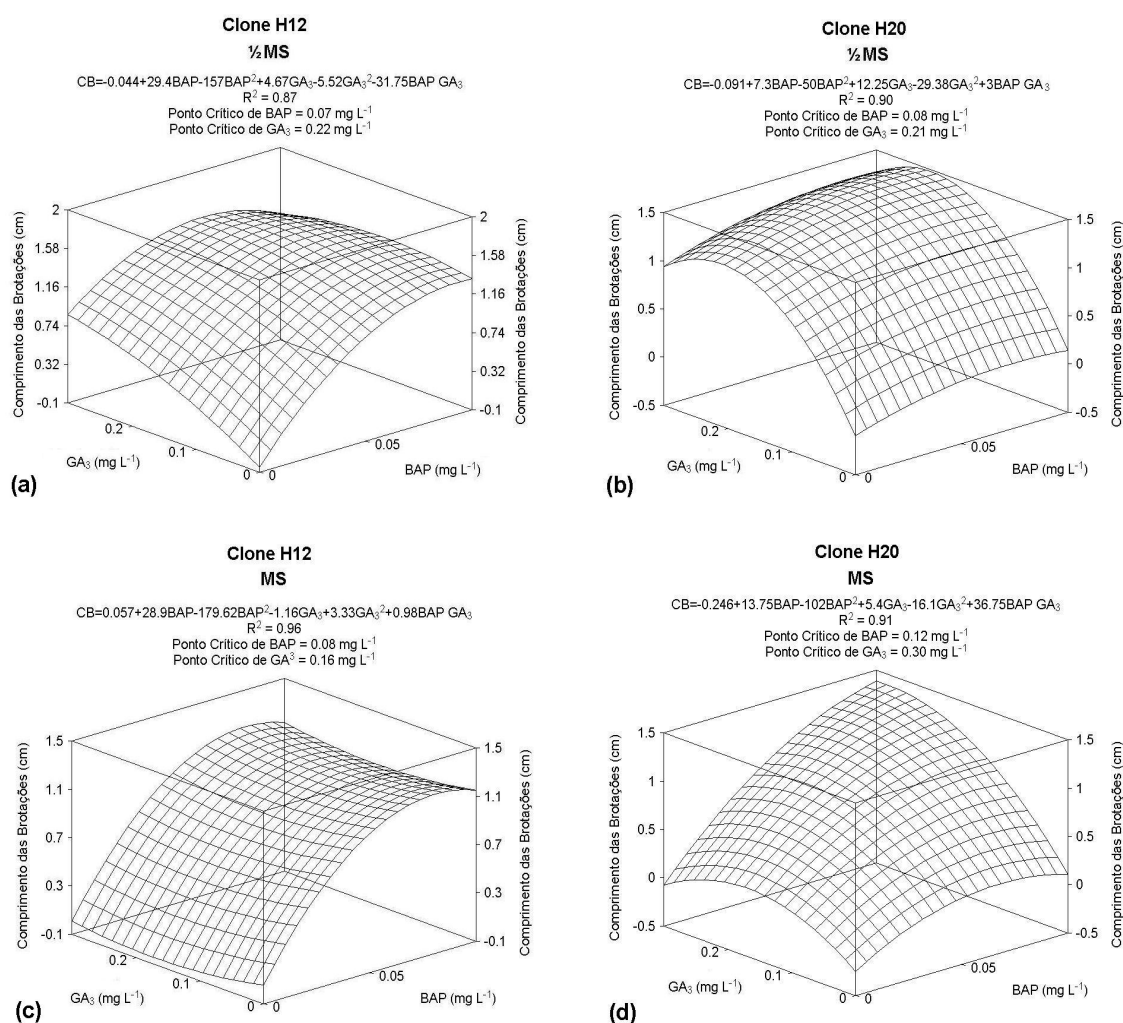
Os clones apresentaram comportamento semelhante em relação ao maior valor do comprimento médio de brotos (CMB) estimado pela equação ajustada, independente do meio de cultura.

O clone H12 apresentou o maior CMB na estimativa da concentração de  $0,07 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,22 \text{ mg L}^{-1}$  de  $GA_3$ , resultando em valor médio de 1,52 cm por brotação alongada em 30 dias após a inoculação, quando cultivado em ½MS (Figura 6a). Nessa mesma composição de meio de cultura, o clone H20 apresentou estimativa do maior valor do CMB igual a 1,5 cm, o qual ocorreu nas concentrações de  $0,08 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,21 \text{ mg L}^{-1}$  de  $GA_3$  (Figura 6b).

Quando o meio de cultura foi o MS, o clone H12 apresentou 1,13 cm nas concentrações de  $0,08 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,16 \text{ mg L}^{-1}$  de  $GA_3$ , o que correspondeu no

maior valor médio observado para essa característica (Figura 6c). Em relação ao clone H20, o maior valor para o CMB ocorreu na combinação de 0,12 mg L<sup>-1</sup> de BAP com 0,30 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, o que resultou em CMB de 1,43 cm por explante (Figura 6d).

No geral, os maiores valores quanto ao CMB ficaram compreendidos entre as concentrações de 0,10 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,20 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, independente do clone e meio de cultura testados. Exceção ocorreu apenas para o clone H20 quando cultivado em meio nutritivo MS, onde a concentração de GA<sub>3</sub> que promoveu o maior CMB foi estimada em 0,30 mg L<sup>-1</sup>.



**FIGURA 6** - Valores médios do comprimento de brotações alongadas (CMB) por explante de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni* em função dos tratamentos de GA<sub>3</sub> e BAP, aos 30 dias após a inoculação. (a): clone H12 e (b): clone H20 em meio 1/2MS, (c): clone H12 e (d): clone H20 em meio MS.

Diversos trabalhos utilizaram diferentes combinações de citocininas e giberelinas para induzir o alongamento de brotações, principalmente para materiais genéticos de difícil propagação *in vitro*. Joshi *et al.* (2003) observaram multiplicação seguida de alongamento das brotações de árvores de 30 anos de idade de *E. tereticornis* x *E. grandis*. O comprimento médio das brotações alongadas variou de 2,5 a 3 cm durante 30 dias após a inoculação em meio MS suplementado com 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,04 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>.

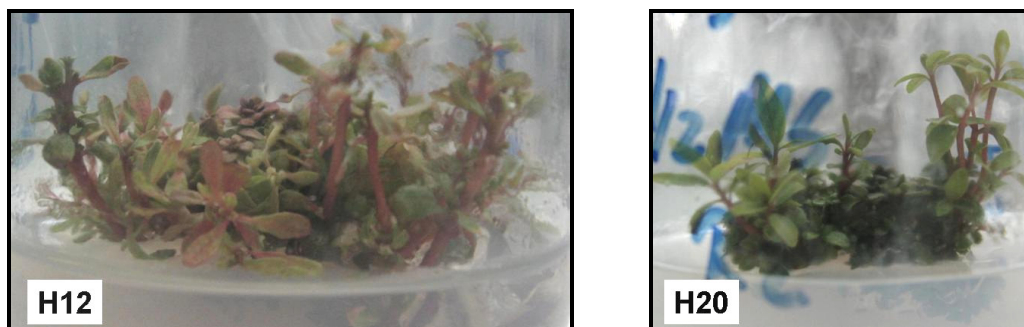
Efeitos semelhantes foram constatados por Bisht *et al.* (1999) ao trabalhar com *E. tereticornis* x *E. camaldulensis*. Os autores observaram multiplicação seguida de alongamento após um período de 120 dias de cultivo em meio MS suplementado com BAP e ANA. Ao final de 180 dias de cultivo em meio MS ocorreu alongamento em todos os tratamentos de BAP e ANA, resultando em brotos de 2,0 cm a 3,5 cm de comprimento.

Barrueto Cid *et al.* (1999) alongaram gemas regeneradas de folhas cotiledonares em meio de cultura SP (MS modificado) suplementado com 1,0 µmol de BAP (≈ 0,24 mg L<sup>-1</sup>), 0,5 µmol de ANA (≈ 0,09 mg L<sup>-1</sup>) e 2,0 µmol de GA<sub>3</sub> (≈ 0,7 mg L<sup>-1</sup>) e, durante um intervalo de 20 a 30 dias de cultivo obtiveram brotações vigorosas e com tamanho médio de 1,5 cm. Santos *et al.* (2004) observaram que a combinação de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIB e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP resultou nos melhores efeitos para o alongamento de brotações de *E. urophylla*.

Em estudo realizado por Fantini Junior e Graça (1990) foi constatado que o uso da concentração integral de sais do meio MS aumentou o crescimento em altura das brotações e o número de brotações alongadas em relação ao meio ½MS. Contudo, no meio ½MS a uma razão reduzida de BAP em relação ao AIB (1:5) resultou em brotações mais alongadas, enquanto para o meio MS acrescido de GA<sub>3</sub> a uma relação inversa desses fitorreguladores de crescimento resultou na maior altura de brotações. No geral, os maiores incrementos em altura foram verificados na concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>.

Em termos gerais, aos 30 dias após a inoculação, os explantes cultivados em ½MS suplementado com 0,10 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,10 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> para o clone H12 e 0,10 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,20 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> para o clone H20 apresentaram o melhor padrão de desenvolvimento quanto ao número de brotações alongadas e o comprimento de brotações. Nessas condições, as brotações expressaram boa aparência e vigor, com tamanho médio variando em torno de 1,5 cm (Figura 7).

O GA<sub>3</sub> adicionado ao meio de cultura na ausência de BAP resultou em brotações alongadas muito finas e frágeis, não sendo aconselhado o seu uso isoladamente para o material genético estudado. Segundo Grattapaglia e Machado (1998) o uso de altas concentrações de GA<sub>3</sub> pode resultar em alongamento excessivo e folhas deformadas, ou até, inibir a proliferação de partes aéreas.



**FIGURA 7** - Detalhe das brotações alongadas em meio de cultura  $\frac{1}{2}$ MS aos 30 dias após a inoculação dos explantes na combinação de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> para o clone H12 e na combinação de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,2 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> para o clone H20. Foto: Brondani (2007).



## 4 CONCLUSÕES

- Considerando as condições experimentais, recomenda-se para a assepsia de segmentos nodais o uso de 0,5% de cloro ativo (NaOCl).
- A porcentagem de estabelecimento dos segmentos nodais foi satisfatória, ficando acima de 45%.
- De todas as fontes de contaminação, a fúngica foi responsável pela maior perda de material.
- O clone H19 mostrou-se altamente recalcitrante ao cultivo *in vitro*.
- A combinação de 0,50 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ANA em meio básico ½MS proporcionaram os melhores resultados quanto ao número de gemas proliferadas para os clones H12 e H20.
- A concentração de 0,10 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> para o clone H12 e a de 0,20 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> para o clone H20, ambas combinadas com 0,10 mg L<sup>-1</sup> de BAP em meio básico ½MS, promoveram os melhores resultados quanto ao alongamento das brotações.
- O efeito do GA<sub>3</sub> sobre o padrão de resposta para o tamanho dos brotos dependeu da composição básica do meio de cultura, sendo que o ½MS proporcionou as melhores respostas para as características analisadas.

## REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. *et al.* **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 442 p.
- ANDRADE, W. F. de; ALMEIDA, M. de; GONÇALVES, A. N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1715-1719, 2006.
- AREZKI, O. *et al.* Changes in peroxidase activity, and level of phenolic compounds during light-induced plantlet regeneration from *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. nodes *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, v. 33, n. 3, p. 215-219, 2001.
- BARRUETO CID, L. P. *et al.* Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 56, n. 1, p. 17-23, 1999.
- BENNETT, I. J. *et al.* Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. **Annals of Botany**, v. 74, p. 53-58, 1994.
- BILLARD, C. E.; LALLANA, V. H. Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus dunnii*. **Ciencia, Docencia y Tecnología**, n. 30, p. 199-216, 2005.
- BISHT, P. *et al.* Micropropagation of newly produced F<sub>1</sub> hybrid of *Eucalyptus* (*E. tereticornis* Sm. x *E. camaldulensis* Dehn. Southern Form). **Silvae Genetica**, v. 48, n. 2, p. 104-108, 1999.
- BRONDANI, G. E. *et al.* *In vitro* establishment and multiplication of the hybrid *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage x *E. dunnii* Maiden. In: IUFRO - TREE BIOTECHNOLOGY. PROPAGATION AND *IN VITRO* MANIPULATION, 2007, Ponta Delgada. **Proceedings...** Ponta Delgada, Azores, Portugal, 2007. p. 15.
- BUNN, E. Development of *in vitro* methods for *ex situ* conservation of *Eucalyptus impensa*, an endangered mallee from southwest Western Australia. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 83, n. 1, p. 97-102, 2005.
- BUNN, E. *et al.* *In vitro* propagation of *Eucalyptus phylacis* L. Johnson and K. Hill., a critically endangered relict from Western Australia. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 41, n. 6, p. 812-815, 2005.
- CAMPINHOS, E. N. *et al.* Hidrojardim clonal Champion: uma otimização na produção de mudas de eucalipto. **Silvicultura**, São Paulo, v. 19, n. 80, p. 42-46. 1999.
- DEL PONTE, E. M. *et al.* Multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus* subsp. *globulus* Labill. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 1-8, 2001.

DIBAX, R. **Transformação genética de *Eucalyptus saligna* com o gene *P5CSF129A* via *Agrobacterium tumefaciens***. 112 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

EMBRAPA. Núcleo Tecnológico para Informática. **SOC – Software Científico**. Campinas, 1990.

FANTINI JUNIOR, M.; GRAÇA, M. E. C. Propagação *in vitro* de *Eucalyptus saligna*. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., Campos do Jordão. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1990. p. 373-378.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Edington: Exegetics, 2<sup>nd</sup> Edition, v. 1, 1993. 574 p.

GLOCKE, P.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. 6-benzylamino purine stimulates *in vitro* shoot organogenesis in *Eucalyptus erythronema*, *E. stricklandii* and their interspecific hybrids. **Scientia Horticulturae**, v. 109, n. 4, p. 339-344, 2006.

GLOCKE, P. *et al.* Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus erythronema* x *Eucalyptus stricklandii* cv. 'Urrbrae Gem'. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 42, n. 2, p. 139-143, 2006.

GOMES, F.; CANHOTO, J. M. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (Shining Gum). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 39, n. 3, p. 316-321, 2003.

GRAÇA, M. E. C. *et al.* Efeitos das citocininas benzilamino purina e thidiazuron, na multiplicação "in vitro" de brotações de *Eucalyptus dunnii* Maid. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 43, p. 107-112, 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v. 1, 1998. p. 183-260.

HAJARI, E. *et al.* Plant regeneration from induced callus of improved *Eucalyptus* clones. **South African Journal of Botany**, v. 72, n. 2; p. 195-201, 2006.

HARTMANN, H. T. *et al.* **Plant propagation: principles and practices**. 7<sup>th</sup> Edition, New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880 p.

JOSHI, I. *et al.* *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F<sub>1</sub> hybrid (*Eucalyptus tereticornis* Sm. x *E. grandis* Hill ex. Maiden). **Silvae Genetica**, v. 52, n. 3/4, p. 110-113, 2003.

LIMA, M. M. de; GONÇALVES, A. N. Efeito do thidiazuron na multiplicação *in vitro* de gemas de um clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus tereticornis*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 53, p. 49-56, 1998.

MERKLE, S. A.; NAIRN, C. J. Hardwood tree biotechnology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 41, n. 5, p. 602-619, 2005.

MSTAT – **Statistics Program**. Michigan, USA: Crop and Soil Department Science – FREED, R. D., Director, Michigan State University, 1994.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473-497, 1962.

NEHRA, N. S. *et al.* Invited review: forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 41, n. 6, p. 701-717, 2005.

SANTOS, D. C. dos *et al.* **Alongamento in vitro de *Eucalyptus urophylla***. Colombo: Embrapa Florestas - CNPF, 2004. 4 p. (Comunicado Técnico, 120).

SHARMA, S. K.; RAMAMURTHY, V. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 5, p. 511-518, 2000.

SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152 p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v. 1, 1998. p. 11-20.

WATT, M. P. *et al.* *In vitro* field collection techniques for *Eucalyptus* micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, n. 3, p. 233-240, 2003.

WENDLING, I.; FERRARI, M. P.; GROSSI, F. **Curso intensivo de viveiros e produção de mudas**. Colombo: Embrapa Florestas, 2002. 48 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 79).

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 20, n. 1, p. 9-16, 1996.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Enraizamento “ex vitro” de gemas de *Eucalyptus* spp. multiplicadas e alongadas “in vitro”. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 51, p. 29-36, 1997.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p. 55-74.

## **ANEXOS**

**ANEXO 1** - Resumo da análise de variância com decomposição dos tratamentos em regressão polinomial, para as características da contaminação fúngica (F), contaminação bacteriana (B), explantes oxidados (O), explantes estabelecidos (E), número de folhas (NF), comprimento médio de broto (CMB) e número de brotações (NB) de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dun nii*, em função dos tratamentos de cloro ativo.

Causas da Variação	GL	Soma de Quadrados						
		F <sup>(1)</sup>	B <sup>(1)</sup>	O <sup>(1)</sup>	E <sup>(1)</sup>	NF	CMB	NB
		----- (%) -----				(expl. <sup>-1</sup> )	(cm expl. <sup>-1</sup> )	(expl. <sup>-1</sup> )
Cloro (CLR)	3	0,456	0,049	0,085	0,518	4,98	0,081	0,45
1º grau	1	0,020 <sup>ns</sup>	0,008 <sup>ns</sup>	0,022 <sup>ns</sup>	0,033 <sup>ns</sup>	1,76 <sup>ns</sup>	0,012 <sup>ns</sup>	0,40 <sup>ns</sup>
2º grau	1	0,142 <sup>ns</sup>	0,013 <sup>ns</sup>	0,040 <sup>ns</sup>	0,349 <sup>ns</sup>	0,42 <sup>ns</sup>	0,060 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>
3º grau	1	0,294 <sup>ns</sup>	0,029 <sup>ns</sup>	0,023 <sup>ns</sup>	0,136 <sup>ns</sup>	2,80 <sup>ns</sup>	0,009 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>
Resíduo	56	8,233	2,439	1,965	6,921	56,00	1,82	10,80
Média	-	41,33	3,33	3,00	52,33	5,48	0,74	1,75
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	24,64	26,39	23,87	20,32	18,24	24,42	25,09

<sup>ns</sup> não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

<sup>(1)</sup> dados transformados por  $\sqrt{n + 0,5}$ .

GL = graus de liberdade, CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental, expl. = explante.

**ANEXO 2** - Resumo da análise de variância com decomposição dos tratamentos em regressão polinomial, para as características do número médio de gemas por explante (NG) de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dun nii*, em função dos diferentes clones (H12 e H20) e concentrações de BAP e ANA.

Causas da Variação	GL	Soma de Quadrados	
		H12 (explante <sup>-1</sup> )	H20 (explante <sup>-1</sup> )
BAP	4	660,928**	1.375,648**
ANA	4	11,408**	250,288**
BAP x ANA	16	420,432**	1.220,672**
Resíduo	100	72,000	85,200
Média	-	6,18	8,26
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	13,72	11,18
SQM	-	844,208	2.141,092
SQT	-	1.092,768	2.846,608
R <sup>2</sup>	-	0,77	0,75

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

GL = graus de liberdade, CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental, SQM = soma de quadrados do modelo, SQT = soma de quadrados do tratamento, R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação.

**ANEXO 3** - Resumo da análise de variância com decomposição dos tratamentos em regressão polinomial, para as características do número médio de brotações alongadas por explante (NB) de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, em função dos diferentes clones (H12 e H20), meio de cultura ( $\frac{1}{2}$ MS e MS) e concentrações de BAP e GA<sub>3</sub>.

Causas da Variação	GL	Soma de Quadrados			
		----- Clone H12 -----		----- Clone H20 -----	
		$\frac{1}{2}$ MS (explante <sup>-1</sup> )	MS (explante <sup>-1</sup> )	$\frac{1}{2}$ MS (explante <sup>-1</sup> )	MS (explante <sup>-1</sup> )
BAP	2	378,88**	45,50**	63,50**	31,29**
GA <sub>3</sub>	3	428,73**	3,42**	136,73**	31,50**
BAP x GA <sub>3</sub>	6	400,96**	6,83**	93,33**	19,88**
Resíduo	36	11,25	7,50	39,75	5,00
Média	-	4,44	1,38	2,81	1,08
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	12,60	33,20	37,36	34,40
SQM	-	910,42	47,65	214,62	62,23
SQT	-	1.208,57	55,75	293,56	82,67
R <sup>2</sup>	-	0,75	0,85	0,73	0,75

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

GL = graus de liberdade, CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental, SQM = soma de quadrados do modelo, SQT = soma de quadrados do tratamento, R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação.

**ANEXO 4** - Resumo da análise de variância com decomposição dos tratamentos em regressão polinomial, para as características do comprimento médio de brotações alongadas por explante (CMB) de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, em função dos diferentes clones (H12 e H20), meio de cultura ( $\frac{1}{2}$ MS e MS) e concentrações de BAP e GA<sub>3</sub>.

Causas da Variação	GL	Soma de Quadrados			
		----- Clone H12 -----		----- Clone H20 -----	
		$\frac{1}{2}$ MS <sup>(1)</sup> (cm explante <sup>-1</sup> )	MS <sup>(1)</sup> (cm explante <sup>-1</sup> )	$\frac{1}{2}$ MS <sup>(1)</sup> (cm explante <sup>-1</sup> )	MS <sup>(1)</sup> (cm explante <sup>-1</sup> )
BAP	2	1,72**	3,09**	0,13**	1,84**
GA <sub>3</sub>	3	0,36**	0,04**	3,13**	1,21**
BAP x GA <sub>3</sub>	6	0,63**	0,08**	0,12**	0,65**
Resíduo	36	0,13	0,09	0,29	0,03
Média	-	1,04	0,70	0,90	0,54
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	5,06	4,71	7,74	3,24
SQM	-	2,35	3,10	3,05	3,37
SQT	-	2,71	3,21	3,37	3,70
R <sup>2</sup>	-	0,86	0,96	0,90	0,91

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

<sup>(1)</sup> dados transformados por  $\sqrt{n+0,5}$ .

GL = graus de liberdade, CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental, SQM = soma de quadrados do modelo, SQT = soma de quadrados do tratamento, R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação.

## RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Na literatura existem vários estudos que destacam os ganhos positivos do emprego da miniestaquia e micropropagação na silvicultura clonal do eucalipto. No entanto, apesar de todos os avanços percebe-se uma carência de informações a respeito dos fatores externos e internos que influenciam tais técnicas de clonagem e a diversidade de respostas dos diferentes materiais genéticos tornam ainda mais complexo o entendimento desses fatores. Quando se leva em consideração os eucaliptos subtropicais, a carência de estudos é ainda maior.

No presente estudo, os clones de *E. benthamii* x *E. dunnii* apresentaram comportamento contrário às expectativas iniciais, as quais foram baseadas em materiais genéticos tropicais mais estudados. Na miniestaquia esperava-se aumento dos índices de enraizamento nos períodos mais quentes, no entanto esse efeito não ocorreu, sendo observado os melhores índices de enraizamento nos períodos com temperaturas mais baixas. Na micropropagação esperava-se bom desempenho *in vitro* dos clones, no entanto, apesar das plantas-matrizes terem aproximadamente um ano de idade, o material mostrou-se de difícil cultivo.

Dessa forma, muitas questões ainda persistem quanto ao entendimento dos reais efeitos que estão envolvidos na propagação vegetativa do híbrido. Dentre os vários estudos que ainda podem ser executados, são necessárias pesquisas nas linhas:

### MINIESTAQUIA

- Estudos envolvendo o efeito da luminosidade e temperatura, tanto em nível de produção de propágulos vegetativos quanto o posterior enraizamento;
- Testar diferentes soluções nutritivas no cultivo das minicepas, visto que, a base nutricional pode ser um fator decisivo para o sucesso do enraizamento.



## MICROPROPAGAÇÃO

- Testar diversos meios de cultura, tanto nas fases de multiplicação quanto no alongamento de brotações;
- Comparar o efeito de diferentes fitorreguladores em relação aos utilizados no presente estudo;
- Estudar os efeitos da luminosidade e temperatura *in vitro*;
- Desenvolver estudos pertinentes ao enraizamento, tanto *in vitro* quanto *ex vitro*.

Essas investigações mostram-se essenciais e serão importantes para o entendimento dos fatores que estão envolvidos na miniestaquia e micropropagação do material genético. Futuramente, os resultados poderão auxiliar nas estratégias de manejo a serem adotadas para aumentar os índices de enraizamento e, conseqüentemente, a produção de mudas de eucaliptos subtropicais.